

4



DE00 / 364

REC'D	03 APR 2000
WIPO	PCT

Bescheinigung

Herr Professor Dr. Jörn B u l l e r d i e k in Bremen/Deutschland hat eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Mittel zur Prävention und/oder Behandlung einer Gewebeveränderung mesenchymalen Ursprungs"

am 13. September 1999 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprünglichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig die Symbole A 61 K, C 12 Q und C 12 M der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 22. März 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag

Aktenzeichen: 199 43 786.6

**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft ein Mittel zur Prävention und/oder Behandlung einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt und das Mittel ein anti-viral wirksames Agens umfaßt, das gegen ein Virus wirksam ist, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt, sowie ein Mittel zur Prävention und/oder Behandlung einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt und das Mittel ein anti-viral wirksames Agens umfaßt, das gegen ein Virus wirksam ist, dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt.

BOEHMERT & BOEHMERT

ANWALTSSOZIETÄT

Boehmert & Boehmert · P.O.B. 43 02 54 · D-80732 München

Deutsches Patent- und Markenamt
Zweibrückenstr. 12

80297 München

DR.-ING. KARL BOEHMERT, PA (1899-1973)
DIPL.-ING. ALBERT BOEHMERT, PA (1902-1993)
WILHELM J. H. STAHLBERG, RA, Bremen
DR.-ING. WALTER HOORMANN, PA*, Bremen
DIPL.-PHYS. DR. HEINZ GODDAR, PA*, München
DR.-ING. ROLAND LIESEGANG, PA*, München
WOLF-DIETER KUNTZE, RA, Bremen, Alicante
DIPL.-PHYS. ROBERT MÜNZHUBER, PA (1933-1993)
DR. LUDWIG KOUKER, RA, Bremen
DR. (CHEM.) ANDREAS WINKLER, PA*, Bremen
MICHAELA HUTH-DIERIG, RA, München
DIPL.-PHYS. DR. MARION TONHARDT, PA*, Düsseldorf
DR. ANDREAS EBERT-WEIDENFELLER, RA, Bremen
DIPL.-ING. EVA LIESEGANG, PA*, München

PROF. DR. WILHELM NORDEMANN, RA, Bredenbergs
DR. AXEL NORDEMANN, RA, Berlin
DR. JAN BERND NORDEMANN, LLM, RA, Berlin
DIPL.-PHYS. EDUARD BAUMANN, PA*, Höhenkirchen
DR.-ING. GERALD KLOPSCH, PA*, Düsseldorf
DIPL.-ING. HANS W. GROENING, PA*, München
DIPL.-ING. SIEGFRIED SCHIRMER, PA*, Bielefeld
DIPL.-PHYS. LORENZ HANEWINKEL, PA*, Paderborn
DIPL.-ING. DR. JAN TONNIES, PA, RA, Kiel
DIPL.-PHYS. CHRISTIAN BIEHL, PA*, Kiel
DIPL.-PHYS. DR. DOROTHÉE WEBER-BRULS, PA*, Frankfurt
DR.-ING. MATTHIAS PHILIPP, PA*, Bremen
DIPL.-PHYS. DR. STEFAN SCHOHE, PA*, München
MARTIN WIRTZ, RA, Düsseldorf
DR. DETMAR SCHÄFER, RA, Bremen
DIPL.-CHEM. DR. ROLAND WEIB, PA, Düsseldorf
DIPL.-PHYS. DR.-ING. UWE MANASSE, PA, Bremen
DR. CHRISTIAN CZYCHOWSKI, RA, Berlin
DR. CARL-RICHARD HAARMANN, RA, München
DIPL.-BIOL. DR. ARMIN K. BOHMANN, PA, München
DIPL.-PHYS. DR. THOMAS L. BITTNER, PA, Berlin
DR. VOLKER SCHMITZ, RA, München
DR. FRIEDRICH NICOLAUS HEISE, RA, Potsdam

PA - Patentanwalt/Patent Attorney
RA - Rechtsanwalt/Attorney at Law
* - European Patent Attorney
Alle zugelassen zur Vertretung vor dem Europäischen Markenamt, Alicante
Professional Representation at the Community Trademark Office, Alicante

In Zusammenarbeit mit/in cooperation with

DIPL.-CHEM. DR. HANS ULRICH MAY, PA*, München

Ihr Zeichen
Your ref.

Ihr Schreiben
Your letter of

Unser Zeichen
Our ref.

München,

Neuanmeldung
(Patent)

BM3960

13. September 1999

Prof. Dr. Jörn Bullerdiek, Weißdornpfad 14, 28355 Bremen

Mittel zur Prävention und/oder Behandlung einer Gewebeveränderung mesenchymalen Ursprungs

Die Erfindung betrifft Mittel zur Prävention und/oder Behandlung einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt, Verwendung der Mittel, Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen mesenchymalen Ursprungs und/oder zum Ermitteln von Viren, gegen die das erfindungsgemäße Mittel gerichtet ist sowie Verwendungen des Verfahrens, Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Gewebeveränderungen mesenchymalen Ursprungs beteiligten Viren sowie Verfahren zur Diagnose einer Gewe-

beveränderung, wobei die Gewebeveränderung eine Gewebeveränderung mesenchymalen Ursprungs ist.

Die Behandlung von Gewebeveränderungen wie Tumoren und Karzinomen ist trotz intensivster Bemühungen der modernen Medizin noch immer vergleichsweise beschränkt auf Chemotherapie in ihren vielfältigsten Abwandlungen und chirurgische Eingriffe. Bei weitem problematischer ist die Prävention derartiger Gewebeerkrankungen. In der Regel gilt es dabei, die für die Gewebeveränderung verantwortlichen Faktoren für den individuellen Lebensbereich auszuschließen, was jedoch nicht immer möglich ist.

Ein besonderer Problemkreis ist die Prävention und Behandlung von Gewebeveränderungen mit mesenchymalen Ursprung. Bis zum heutigen Tage ist die der so verschiedenen Tumoren wie Leiomyom, Endometrium-Polyp, Endometriose, Hamartom der Lunge und der Mamma, Prostata-Adenom, Atherom und vieler mehr, zugrundeliegende Ätiologie nicht bekannt, was dazu führt, daß für diese Art der Erkrankungen nur eine symptomatische Therapie bleibt. Unter diesen Umständen ist eine Prävention ganz besonders schwierig, weiß doch der Einzelne nicht, wie er durch sein eigenes Verhalten das Risiko, an einer derartigen Gewebeveränderung zu erkranken, verringern kann.

Beispielhaft sei hier auf die Leiomyome des Uterus hingewiesen. Diese sind, selbst wenn sie gutartig ausgebildet sind, ein gesundheitspolitisches Problem. So haben Studien ergeben, daß in den westeuropäischen Staaten jede dritte Frau Uterusleiomyome aufweist und bspw. in den USA jeder fünfte Besuch beim Gynäkologen aufgrund von Myomen erfolgt (Morton, C.C.; Am. J. Pathol. 1998; 153(4): 1050-20). Wenn diese Leiomyome sich symptomatisch äußern, kann dies z. B. mit erheblichen Blutungen und damit gesundheitlichen Risiken, Schmerzen und Harninkontinenz verbunden sein. Darüber hinaus können diese Leiomyome Infertilität bei den betroffenen Frauen zur Folge haben.

Trotz vielfältiger Bemühungen war die Ätiologie/Pathogenese von Uterusleiomyomen bisher unklar (Morton aaO.). Verschiedene mögliche Ursachen von Uterus-Leiomyomen werden

bspw. von Cramer, S.F. et al. (Cramer S.F.; J. Reprod. Med. 1995, 40(8): 595-600) diskutiert, so bspw. Verletzung und Reparatur des Endometriums. Auch die Beteiligung von Östrogen und/oder Progesteron und Östrogen-und/oder Progesteron-Rezeptoren bei der Entstehung von Neoplasmen der glatten Muskulatur des Uterus wurde(=) in der Literatur diskutiert, so z. B. von Tiltman A.J. (Tiltman A.J.; Curr. Opin. Obstet. Gynecol., 1997; 9(1):48-51. Aufgrund von verschiedenen Untersuchungen hat sich jedoch die Vorstellung entwickelt, daß Mutationen der Gene der HMGI(Y)-Familie daran beteiligt sind (siehe Schoenmakers E.F. et al.; Nat. Genet. 1995, 10(4):436-44), wobei nach wie vor ungeklärt ist, ob es sich bei den besagten Mutationen um primäre oder sekundäre Ereignisse handelt.

Trotz dieser Erkenntnis stehen für die Myome derzeit nur zwei Therapieansätze zur Verfügung, zum einen die operative Entfernung der Gebärmutter (Hysterektomie), so alleine in den USA pro Jahr ca. 200.000 Hysterektomien (Morton, aaO), oder die Myomenukleation, d.h. das „Herausschälen“ der Tumoren, bei Uterus-Erhaltung. Im Falle der Myomenukleation kann präoperativ eine medikamentöse Myomverkleinerung herbeigeführt werden unter Verwendung von Hormon-Antagonisten, die jedoch insoweit mit unerwünschten Nebenwirkungen verbunden sind, als daß dadurch menopausale Beschwerden ausgelöst werden.

Es besteht somit für Leiomyome, insbesondere solche des Uterus, sowie Endometriumpolypen und Endometriose ein dringender Bedarf an neuen Konzepten für Therapie und Präventionen und den hierfür geeigneten Mitteln.

Es ist somit eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, Mittel zur Prävention und Behandlung von Gewebeveränderungen bereitzustellen, wobei die Gewebeveränderung Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt.

Weiterhin ist es eine Aufgabe der vorliegenden Erfindung, ein Verfahren bereitzustellen, mit dem jene wesentlichen Komponenten ermittelt werden können, die zur Herstellung der erfindungsgemäßen Mittel geeignet bzw. erforderlich sind.

Schließlich ist es noch eine Aufgabe der Erfindung, eine Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Gewebeveränderungen beteiligten Agens bereitzustellen, wobei die Gewebeveränderung Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt.

Des weiteren liegt der Erfindung die Aufgabe zugrunde, ein Verfahren zur Diagnose einer Gewebeveränderung bereitzustellen, wobei die Gewebeveränderung Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt, und einen hierzu geeigneten Kit.

Die Aufgabe wird erfindungsgemäß gelöst durch ein Mittel zur Prävention und/oder Behandlung einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung mindestens ein Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt und das Mittel ein anti-viral wirksames Agens umfaßt, das gegen ein Virus wirksam ist, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt.

Weiterhin wird die Aufgabe erfindungsgemäß gelöst durch ein Mittel zur Prävention und/oder Behandlung einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung mindestens ein Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt und das Mittel ein anti-viral wirksames Agens umfaßt, das gegen ein Virus wirksam ist, dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt.

Bei den erfindungsgemäßen Mitteln kann vorgesehen sein, daß die Bindungsstelle auf der Nukleinsäure des Virus das Struktur- und Sequenzmerkmal einer ersten AT-reichen Sequenz umfaßt.

In einer Ausführungsform kann vorgesehen sein, daß die Bindungsstelle auf der Nukleinsäure des Virus neben der ersten Sequenz noch die Struktur- und Sequenzmerkmale umfaßt, daß

- eine zweite AT-reiche Sequenz vorhanden ist, und

- die erste und zweite Sequenz in einer räumlichen Distanz zueinander angeordnet sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß die räumliche Distanz so ausgewählt ist, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der Nukleinsäure angeordnet sind.

Bei den erfindungsgemäßen Mitteln kann weiterhin vorgesehen sein, daß die Gene der HMGI(Y)-Familie MAG-Gene, HMGIC, HMGIY, aberrante Transkripte von Genen der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfassen.

In einer Ausführungsform ist vorgesehen, daß das Gewebe mesenchymalen Ursprungs zumindest teilweise mit einem Virus infiziert ist.

In einer weiteren Ausführungsform ist vorgesehen, daß die Gewebeveränderung als ausschließlichen oder obligaten Bestandteil Gewebe umfaßt, wobei wenigstens einige der das Gewebe aufbauenden Zellen mit einem der hierin beschriebenen Viren infiziert sind.

Desweiteren kann vorgesehen sein, daß die Gewebeproliferation eine Proliferation mindestens einer mesenchymalen Zelle, die mit einem der hierin beschriebenen Viren infiziert ist, umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Proliferation eine klonale Proliferation.

Bei den erfindungsgemäßen Mitteln kann vorgesehen sein, daß die Gewebeproliferation eine epitheliale Komponente umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform weist die epitheliale Komponente mindestens eine Zelle auf, die mit einem der hierin beschriebenen Viren infiziert ist.

Weiterhin kann vorgesehen sein, daß die mit einem der hierin beschriebenen Viren infizierte Zelle ein chromosomal Veränderung aufweist.

Dabei ist bevorzugt, wenn die chromosomal Veränderung mindestens ein HMGI(Y)-Gen der infizierten Zelle umfaßt.

In einer weiteren, bevorzugten Ausführungsform ist das HMGI(Y)-Gen aus der Gruppe ausgewählt, die MAG-Gene, HMGIC, HMGIY, aberrante Transkripte von Genen der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfaßt.

Bei den erfindungsgemäßen Mitteln kann vorgesehen sein, daß die Gewebeveränderung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Leiomyome, insbesondere Leiomyome des Uterus; Endometrioplen; Endometriose; Fibroadenome, insbesondere Fibroadenome der Mamma; Phylloides-Tumoren, insbesondere der Mamma; Hamartome, insbesondere der Mamma; Prostata-Adenome; Lipome; aggressive Angiomyxome; Enchondrome; pleomorphe Adenomem, insbesondere der Kopfspeicheldrüsen; Kolon-Polypen, insbesondere Kolon-Adenome; Hamartome, insbesondere der Lunge; Atherome und daraus entstandene Karzinome umfaßt.

Dabei ist bei einer Ausführungsform vorgesehen, daß die entstandenen Karzinome aus der Gruppe ausgewählt sind, die Kolon-Karzinome und Prostata-Karzinome umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Mittel ist vorgesehen, daß das Virus ausgewählt ist aus der Gruppe, die DNA-Viren, und insbesondere Adenoviren und Herpesviren, umfaßt.

Bei den erfindungsgemäßen Mitteln kann vorgesehen sein, daß das Agens ausgewählt ist aus der Gruppe, die Impfstoffe; Antikörper; Mittel, die die Replikation, Transkription oder Translation viralen, insbesondere adenoviraler Gene hemmen; Mittel, die mit Viren, insbeson-

dere Adenoviren, infizierte Zellen erkennen und/oder zerstören; und Mittel, die durch ihre Effektorzellen-stimulierende Wirkung eine antivirale Wirkung erzielen, umfaßt.

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Impfstoff einen Antikörper, der gegen das Virus oder einen Teil davon gerichtet ist.

In einer alternativen bevorzugten Ausführungsform umfaßt der Impfstoff ein Viruspartikel, wie hierin beschrieben, oder einen Teil davon.

In einer weiteren Ausführungsform der erfindungsgemäßen Mittel ist der Antikörper ausgewählt aus der Gruppe, die monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, polyvalente Antikörper, Antikörperfragmente und Derivate davon umfaßt.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch die Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels zur Immunisierung gegen Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie der Gewebeveränderungen, wie hierin beschrieben, verbunden sind.

Des Weiteren wird die Aufgabe gelöst durch eine Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung umfassend das Mittel nach einem der vorangehenden Ansprüche und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger zur Prävention und/oder Behandlung der Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche oder zur Immunisierung gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie der Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche verbunden sind.

Dabei kann in einer Ausführungsform vorgesehen sein, daß die Immunisierung eine aktive Immunisierung ist.

Schließlich wird die Aufgabe auch gelöst durch ein Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen, wie

hierin beschrieben, geeigneter Viren und/oder zum Ermitteln von Viren, gegen die das erfundungsgemäße Mittel gerichtet ist, welches die Schritte umfaßt:

- a) Transfektion einer Zellkultur mit normalem Karyotyp, die abgeleitet ist von einem Gewebe, das die Gewebeveränderung nach einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt, mit einem Expressionsvektor für ein Gen der HMGI(Y)-Familie oder dessen Derivat,
- b) Vergleich des RNA-Musters der transfizierten Zellen mit demjenigen von Kontrollkulturen, und
- c) Überprüfen von in den transfizierten Kulturen gegenüber Kontrollkulturen exprimierten oder verstärkt exprimierten RNA(s) durch Sequenzhomologie auf das Vorhandensein viraler Elemente.

Die Aufgabe wird desweiteren auch gelöst durch ein Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen, wie hierin beschrieben, geeigneter Viren und/oder zum Ermitteln von Viren, gegen die das erfundungsgemäße Mittel gerichtet ist, welches die Durchführung eines PCR-Tests umfaßt, wobei die für die PCR verwendeten Primer(paare) der Sequenz viraler Nukleinsäure entsprechen.

Die Aufgabe wird erfundungsgemäß auch gelöst durch ein Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen, wie hierin beschrieben, geeigneter Viren und/oder zum Ermitteln von Viren, gegen die das erfundungsgemäße Mittel gerichtet ist, welches die Schritte umfaßt:

- a) Anlegen einer cDNA-Bibliothek von einem Gewebe, das die Gewebeveränderung nach einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt, das eine Aktivierung eines Gens der HMGI(Y)-Familie oder eines Derivates aufweist, und

- b) Screenen der cDNA-Bibliothek mit einer virusspezifischen Sonde oder
- c) Analyse der cDNA-Klone auf virale Sequenzen oder
- d) Vergleich mit einer cDNA-Bibliothek aus normalem Myometrium.

In einer Ausführungsform der erfindungsgemäßen Verfahren kann vorgesehen sein, daß das Gen der HMGI(Y)-Familie ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGIC, HMGIY, MAG, aberante Transkripte der Gene der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfaßt.

In einer weiteren Ausführungsform kann das Virus, das virale Element oder die virusspezifische Sonde aus der Gruppe von Viren ausgewählt ist, die Viren umfaßt, wie sie hierin beschrieben sind, d. h. solche Viren, deren Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt oder solche Viren, deren Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt. Zu den vorstehend beschriebenen Viren gehören auch diejenigen, die zu der Gruppe der DNA-Viren gehören, insbesondere Adenoviren, Herpesviren und Papovaviren, die zumindest eines der beiden vorstehend genannten Merkmale aufweisen.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch die Verwendung eines der erfindungsgemäßen Verfahren zum Ermitteln von Viren, gegen die zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen, wie hierin beschrieben, immunisiert werden kann.

Schließlich wird die Aufgabe auch gelöst durch eine Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Gewebeveränderungen, wie hierin beschrieben, beteiligten Virus, welche ein Genprodukt von Genen der HGMI(Y)-Familie oder einen Teil davon oder dessen Derivate umfaßt, das/der an einen Träger gebunden ist.

In einer Ausführungsform ist dabei vorgesehen, daß die virale Nukleinsäure neben der ersten Sequenz noch die Struktur- und Sequenzmerkmale umfaßt, daß

- eine zweite AT-reiche Sequenz vorhanden ist und
- die erste Sequenz und zweite Sequenz in einer räumlichen Distanz zueinander angeordnet sind.

In einer bevorzugten Ausführungsform ist vorgesehen, daß die räumliche Distanz so ausgewählt ist, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der Nukleinsäure angeordnet sind.

Die Aufgabe wird desweiteren gelöst durch ein Verfahren zur Diagnose einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung eine solche Gewebeveränderung umfaßt, wie hierin beschrieben, wobei eine Körperflüssigkeit auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Viren, wie hierin beschrieben, untersucht wird.

Die Aufgabe wird auch gelöst durch ein Verfahren zur Diagnose einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung eine solche Gewebeveränderung umfaßt, wie hierin beschrieben, wobei eine Körperflüssigkeit auf das Vorhandensein von Antigenen von Viren, wie hierin beschrieben, untersucht wird.

Desweiteren wird die Aufgabe gelöst durch ein Verfahren zur Diagnose einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung eine solche Gewebeveränderung, wie hierin beschrieben, umfaßt, wobei eine Gewebeprobe mit einem Mittel umgesetzt wird, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Antikörper, die mit Viren, wie hierin beschrieben, besonders DNA-Viren und ganz besonders Adenoviren und/oder Herpesviren oder Teilen davon reagieren; Antigene, die von Viren, wie hierin beschrieben, besonders DNA-Viren und ganz besonders Adenoviren und/oder Herpesviren oder Teilen davon stammen, und Nukleinsäure, die mit Nukleinsäure

von Viren, wie hierin beschrieben, besonders DNA-Viren und ganz besonders Adenoviren und/oder Herpesviren wechselwirkt, umfaßt, im Falle der Anwesenheit von Viren, wie hierin beschrieben, besonders DNA-Viren und ganz besonders Adenoviren und/oder Herpesviren sich ein Komplex aus dem Mittel und dem Virus bildet und der Komplex nachgewiesen wird.

Bevor im folgenden die Erfindung näher erläutert wird, sollen die hierin verwendeten Begrifflichkeiten in Ergänzung zu dem allgemeinen Verständnis des Fachmannes auf dem Gebiet definiert werden.

Unter Leiomyomen sollen hierin insbesondere benigne Tumoren der glatten Muskulatur verstanden werden (Definition nach Baltzer, J. et al.; Gynäkologie – Ein kurzgefaßtes Lehrbuch, 5. Aufl., 1994, Thieme Verlag).

Unter Endometriumpolypen sollen hierin insbesondere Hyperplasien und polypöse Wachstumsformen des Endometriums mit stromaler und Drüsen-(epithelialer) oder ausschließlich stromaler Komponente verstanden werden.

Unter Endometriose soll hierin insbesondere Endometriumherde, die sich an anderer Stelle als im Cavum uteri (Definition nach Baltzer aaO.) befinden, verstanden werden.

Unter Myomen sollen hierin insbesondere Leiomyome verstanden werden (Definition nach Baltzer aaO.).

Der Erfindung liegt die überraschende Erkenntnis zugrunde, daß Gewebeveränderungen, die ein Gewebe umfassen, das mesenchymalen Ursprungs ist, ein gemeinsamer Pathogenitätsmechanismus zugrunde liegt. Dieser Pathogenitätsmechanismus ist mit der Anwesenheit eines Virus in dem Gewebe mesenchymalen Ursprungs verbunden, wobei das Virus ein solches ist, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt oder das Virus ein solches ist, dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt

von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt. Diese Viren werden hierin auch als „die hierin beschriebenen Viren“ bezeichnet oder Bezug genommen durch den Begriff „wie hierin beschrieben“. Mit anderen Worten, diese Art von Viren sind ein Faktor bei der Auslösung von Gewebeveränderungen, die Gewebe umfassen, das mesenchymalen Ursprungs ist.

Die Gewebeveränderungen können dabei Tumore und/oder Karzinome umfassen. Hinsichtlich des histologischen Aufbaus der besagten Gewebeveränderungen kann festgestellt werden, daß diese vollständig aus solchem Gewebe bestehen können, das sich unter dem Einfluß der besagten Viren verändert hat, oder aber ein Teil des die Gewebeveränderung aufweisenden Gewebes aus solchem Gewebe besteht, das sich unter dem Einfluß der besagten Viren verändert hat, mithin dieser Teil des Gewebes lediglich ein, aber ein obligater Bestandteil der Gewebeveränderung oder Tumors ist.

Die Gewebeveränderung kann des weiteren eine solche sein, bei der die Veränderung auf eine Proliferation von mit den besagten Viren infizierten mesenchymalen Zellen zurückzuführen ist. Gleichzeitig kann die Gewebeveränderung auch eine epitheliale Komponente aufweisen. Unter epithelialer Komponente soll hierin ein Teil der Gewebeveränderung (bspw. des Tumors oder Karzinoms) verstanden werden, der hinsichtlich seines histologische Ursprungs dem Epithel zugewiesen werden kann. Diese histologische Zuweisung erfolgt dabei auf der Basis allgemein akzeptierter Kriterien der Histopathologie.

Bei den Gewebeveränderungen kann dabei auch die Situation vorliegen, daß die Proliferation eine klonale Proliferation ist, d.h. die Proliferation auf ein einzelnes Infektionsereignis zurückgeht, mithin eine einzelne Zellen infolge der Infektion mit den besagten Viren transformiert wird. Infolge der Transformation dieser einzelnen Zelle verändert sich das Verhalten der Zelle, insbesondere ihr Differenzierungszustand und/oder ihr Wachstumsverhalten, was zu der Gewebeveränderung führt. Geht die Gewebeveränderung auf eine einzelne, mit den besagten Viren infizierte Zellen zurück, spricht man von einem monoklonalen Tumor, geht die Gewebeveränderung auf mehrere aber wenige mit den besagten Viren infizierte Zellen zurück,

spricht man von einem oligoklonalen Tumor. Beide Klonalitäten gehen auf den hierin offebarten durch die besagten Viren vermittelten Pathogenitätsmechanismus zurück.

Mit der Infektion der mesenchymalen Zellkomponente von Gewebe durch die besagten Viren, das schließlich die Gewebeveränderung zeigt bzw. diese ausbildet, als universellen Pathogenitätsmechanismus sind eine Reihe von verschiedenen Infektionsszenarien möglich. So kann, z. B. in einem Fall die Primärinfektion in einem Gewebe mesenchymalen Ursprungs erfolgen und auf dieses beschränkt sein. Dabei kann es zu weiteren Gewebeveränderungen kommen, wobei eine Epithelproliferation auftritt, die mittelbar oder unmittelbar Folge der Virusinfektion der mesenchymalen Komponente ist. Beispiele hierfür stellen Hamartome und Endometriose dar. Es ist jedoch auch möglich, daß sich die Primärinfektion auf andere Gewebeteile ausweitet. Dabei kann bspw. auch epitheliales Gewebe infiziert werden, wobei es sich dabei um eine Sekundärinfektion handelt und dieses sekundär infizierte epitheliale Gewebe ebenfalls proliferieren kann. Es ist des weiteren denkbar, daß epitheliales Gewebe zuerst, d.h. primär, durch die besagten Viren infiziert wird und sich ausgehend hiervon eine Sekundärinfektion des mesenchymalen Gewebes oder Gewebeanteils der – späteren – Gewebeveränderung ergibt, die dann zu einer Proliferation des mesenchymalen Gewebes führen kann. Ein Beispiel für das zuletzt beschriebene Szenario stellt das Kolonadenom dar.

Die hierin beschriebenen Viren können während oder nach der Infektion in der Zelle in irgendeiner Form vorliegen. So kann das Virus in den infizierten Zellen episomal oder in das Wirtsgenom integriert vorliegen. Es kann einen lytischen Zyklus durchlaufen, in die Umgebung freigesetzt werden und weitere Zellen infizieren, wie auch oben ausgeführt. Das Virus kann auch in epithelialen Zellen entweder episomal oder in das Genom integriert vorliegen.

Infolge dieses insbesondere beim Menschen hinsichtlich Gewebeveränderungen, die Gewebe, das mesenchymalen Ursprungs ist, umfassen, nach derzeitiger Auffassung des Erfinders, universellen Pathogenitätsmechanismus, der auf der Beteiligung der besagten, d. h. hierin beschriebenen Viren beruht, besteht damit die Möglichkeit, Mittel bzw. Therapiekonzepte zur

18.09.99

- 14 -

Behandlung von all jenen Gewebeveränderungen bereitzustellen, die Gewebe mesenchymalen Ursprung umfassen. Gleiches gilt für die Diagnose derartiger Gewebeveränderungen.

Darüberhinaus kann in Kenntnis dieses Pathogenitätsmechanismus nun auch eine Prävention unter Verwendung der erfindungsgemäßen Mittel betrieben werden. Die Umsetzung dieser fundamentalen Erkenntnis besteht darin, antivirale Mittel zur Behandlung derartiger Gewebeveränderungen zu verwenden. Diese Mittel können insoweit auch bereits bekannte antivirale wirksame Mittel umfassen, solange sie geeignet sind, die Aktivität der hierin beschriebenen Viren zu beeinflussen. Als möglichen Angriffspunkt für eine derartige Beeinträchtigung der viralen Aktivität sind sämtliche Teilschritte bzw. Teilespekte denkbar, einschließlich des Absorptionsvorganges, Internalisierungsvorganges, Integration der viralen DNA in das Wirtsge- nom oder Stabilisierung im Zytoplasma der Wirtszelle, Replikation, Transkription und Translation, Zusammenbau des Viruskapsids und Freisetzung des Viruskapsids. Daneben eignen sich auch besonders Impfstoffe gegen diese Viren sowohl zur Therapie, besonders jedoch zur Prävention derartiger Gewebeveränderungen, wie im folgenden detaillierter ausgeführt werden wird.

Beispielhaft seien in der nachfolgenden Tabelle 1 Gewebeveränderungen angeführt, für die die erfindungsgemäßen Mittel jeweils angewandt werden können bzw. für deren Therapie und Prävention die bereits bekannten antiviralen Mittel, wie sie beispielsweise in Tabelle 2 gezeigt sind, verwendet werden können.

Tabelle 1

Gewebeveränderung/ Tumor	Mesenchymale Komponente	Epitheliale Komponente	Entstehung maligner Tumoren
Leiomyome (Uterus)	wie glatte Muskulatur, monoklonal, ca. 15% Mutationen der HMGI(Y)-Gene	fehlt	Möglichkeit der sarkomatösen Umwandlung fraglich; wenn überhaupt sehr selten
Endometrium-Polyten	Stroma, monoklonal, ca. 45% Mutationen der HMGI(Y)-Gene	polyklonal	Karzinomentstehung aus der epithelialen Komponente
Endometriose	vorhanden (Stroma)	vorhanden	wird nicht diskutiert
Fibroadenome (Mamma)	Stroma, klonale Chromosomenveränderungen beschrieben, ca. 10% Mutationen der HMGI(Y)-Gene	Drüseneipithel	Möglichkeit der Karzinomentstehung aus der epithelialen Komponente fraglich; wenn überhaupt sehr selten
Phyllodes-Tumoren (Mamma)	Stroma, klonale Chromosomenveränderungen / Mutationen der HMGI(Y)-Gene beschrieben	Drüseneipithel	teilweise maligne
Hamartome (Mamma)	wie Fettgewebe, monoklonal, Mutationen der HMGI(Y)-Gene beschrieben	Drüseneipithel	Möglichkeit der Karzinomentstehung aus der epithelialen Komponente fraglich; wenn überhaupt sehr selten
Prostata-Adenome	wie glatte Muskulatur (Synonym: Adenomyome), klonale Chromosomenveränderungen beschrieben	Drüseneipithel	Entstehung von Prostata-Karzinomen

Tabelle 1 (Fortsetzung)

Lipome	Wie Fettgewebe, monoklonal, ca. 40% Mutationen der HMGI(Y)-Gene	fehlt	praktisch keine Umwandlung zum Liposarkom
Aggressive Angiomyxome	Myxoid, klonale Chromosomenveränderungen (Zielgen: <i>HMGIC</i>)	fehlt	charakteristisch: weitlumige Gefäße
Enchondrome	Wie hyaliner Knorpel, klonale Chromosomenveränderungen beschrieben (u.a.12q14-15)	fehlt	praktisch keine Umwandlung zum Chondrosarkom
Pleomorphe Adenome (Kopfspeicheldrüsen)	mesenchymale und gemeinsamer klonaler wird angenommen,	epitheliale Komponente, Ursprung beider Anteile ca. 20% <i>HMGIC</i> -Mut.	Entstehung von Karzinomen <i>ex pleomorphic adenoma</i>
Kolon-Polypen (Kolon-Adenome)	Stroma	Darmepithel	Adenom-Karzinom-Sequenz histologisch gesichert
Hamartome (Lunge)	Wie hyaliner Knorpel, Fettgewebe, glatte Muskulatur, monoklonal, ca. 70% Mutationen der HMGI(Y)-Gene	epitheliale Spalten (Bronchialepithel)	Möglichkeit der Karzinomentstehung aus der epithelialen Komponente fraglich; wenn überhaupt sehr selten
Atherome	u.a. wie glatte Muskulatur, klonale Chromosomenveränderungen beschrieben	Endothelüberzug	wird nicht diskutiert

Tabelle 2: Übersicht über verschiedene antivirale Verbindungen, die im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden können.

Wirkstoff	Handelsname (beispielhaft)	Wirkweise
Adenosinarabinosid	Vidarabin	Hemmung der viralen Replikation
Bromvinyluridinarabinosid	Brovavir, Sorivudin	Hemmung der viralen Replikation
9-(1,3-Dihydroxy-2-propoxy) methylguanin	Gabciclovir	Hemmung der viralen Polymerase
Trinatriumsalz der Phosphonoameisensäure	Foscarnet	Hemmung der viralen Polymerase
Interferon α	Roferon A	Hemmung der viralen Proteinsynthese
Interferon β	Fiblaferon	Hemmung der viralen Proteinsynthese
Interferon γ	Imukin	Hemmung der viralen Proteinsynthese
Immunglobulin	Pentaglobin	Antikörper vermittelte antivirale Wirkung

Neben dem vorstehend geschilderten universellen Pathogenitätsmechanismus hat der Erfinder weiterhin überraschend festgestellt, daß die Entstehung der Gewebeveränderungen, die Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfassen bzw. entsprechender Tumore, aufbauend auf der oben beschriebenen Infektion mit den besagten Viren durch ein zusätzliches Ereignis in synergistischer Weise gefördert wird. Bei diesem zusätzlichen Ereignis handelt es sich um chromosomale Veränderungen, insbesondere um solche, die die HMGI(Y) - Gene betreffen, d.h. Bruchpunkte struktureller Chromosomenaberrationen liegen entweder innerhalb der Gene oder in einer Entfernung von diesen, so daß es durch die strukturellen Chromosomenaberrationen zu einer transkriptionellen De-Regulierung der HMGI(Y)-Gene kommt. Infolge dieser chromosomal Veränderung kommt es zur Expression nunmehr veränderter zellulärer Genprodukte, die mit bestimmten viralen Sequenzen interagieren, wodurch der beobachtete synergistische Effekt bei der Genese der Gewebeveränderungen bedingt wird. Der Begriff der HMGI(Y)-Gene wird im folgenden im Zusammenhang mit den als erfindungsgemäße Mittel offenbarten Impfstoffen noch weiter ausgeführt werden.

Beispiele von Gewebeveränderungen, die neben der Infektion des mesenchymalen Gewebeanteils noch eine chromosomale Veränderung der HMGI(Y) aufweisen ergeben sich aus der obige Tabelle 1, wobei beispielhaft auf Endometriumpolypen, Endometrioseherde, Hamartome der Lunge, Lipome, Fibroadenome der Mamma und pleomorphe Adenome der Speicheldrüsen verwiesen wird. Wie auch insbesondere aus Tabelle 1 ersichtlich, kann der Anteil derjenigen Gewebeveränderungen, die neben der viralen Infektion noch eine chromosomale Veränderung der HMGI(Y)-Gene tragen, schwanken. Der Nachweis der chromosomal Veränderung ist beispielsweise beschrieben in Kazmierczak et. al., Oncogene 12: 515 – 521.

Wie bereits vorstehend erwähnt, setzt die Prävention und Therapie mesenchymaler Gewebeveränderungen, die Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfassen, bei einer antiviralen Therapie an. Die Gewebeveränderungen können jedoch neben der viralen Infektion noch chromosomal Veränderung betreffend die HMGI(Y)-Gene aufweisen. Auch derartige Gewebeveränderungen können, da auch sie letzten Endes auf einer viralen Aktivität beruhen, mit den hierin vorgeschlagenen Mitteln behandelt bzw. verhindert werden. Damit werden auch die

eingangs beschriebenen Untersuchungen von Schoenmakers (a.a.O.) betreffend Mutationen der Gene der HMGI(Y)-Familie an Uterus-Leiomyomen erklärlich, wenngleich aus dem darin geschilderten Befund, die hierin offenbarte technische Lehre nicht abgeleitet werden konnte. Die Pathogenese der Leiomyome beruht eben nicht nur auf Mutationen, insbesondere Chromosomenaberrationen im Bereich der Loci von Mitgliedern der HMGI(Y)-Genfamilie, sondern es handelt sich, zumindest bei einigen dieser Fälle, d. h. Gewebeveränderung unter Beteiligung eines Gewebes mesenchymalen Ursprungs mit einer Mutation im Bereich der Gene der HMGI(Y)-Gene, um eine Folge aus dem Zusammenwirken von Mutationseignissen der Mitglieder der HMGI(Y)-Genfamilie und einem Virus, insbesondere eines transformierenden Virus, bzw. Infektion mit einem solchen handelt, wobei die virale Infektion selbst bereits ausreicht, um eine Myomentstehung auszulösen, dessen Wachstumspotential durch eine - ggf. nachfolgende - Mutation von Genen der HMGI(Y)-Familie verstärkt wird.

Ohne im folgenden durch diese Annahmen beschränkt sein zu wollen, insbesondere nicht im Detail, scheint es derzeit so zu sein, daß infolge der Infektion mit einem transformierenden Virus sowie dessen folgende Persistenz, mutmaßlich nach Integration in das zelluläre Genom, in Zellen ohne weitere Mutation von Genen der HMGI(Y)-Familie die transformierenden viralen Proteine exprimiert, ggf. nur schwach, werden und die resultierenden Tumoren daher sehr langsam wachsen und klein bleiben. Infolge einer mutationsbedingten Re-Aktivierung von Genen der HMGI(Y)-Familie, z. B. durch Verlagerung von Enhancern in Juxta-Position zu den Genen, kommt es zu einer verstärkten Aktivierung der Gene der transformierenden Proteine und einer insgesamt erhöhten Expression derselben. Die in der Zelle vermehrt vorhandenen transformierenden Proteine führen zu einer deutlich höheren Wachstumsaktivität der entsprechenden Tumoren und somit zu einem verstärkten Tumorwachstum.

Konkret hat man gefunden, daß die Genprodukte der Mitglieder der Gene der HMGI(Y)-Familie, die typischerweise an Nukleinsäuren binden können, so bspw. beschrieben von French, S.W. et al. (French, S.W. et al.; Mol. Cell Biol., 1996; 16(10): 5393-99; Yie, J. et al.; Mol. Cell Biol., 1997, 17(7): 3649-62), auch an Nukleinsäure von transformierenden Viren binden, wobei bei Bindung im Bereich der regulatorischen Regionen der Nukleinsäure (z.B.

Promotoren und Enhancer) die Genprodukte der Gene der HMGI(Y)-Familie auf die Transkriptionsrate der viralen transformierenden Proteine Einfluß nehmen.

Weiterhin hat man gefunden, daß die Genprodukte der Mitglieder der Gene der HMGI(Y)-Familie auch mit einem Genprodukt einer viralen Nukleinsäure wechselwirken können.

Diese Wechselwirkung kann in einer direkten Wechselwirkung der beiden Genprodukte, d.h. dem Genprodukt der viralen Nukleinsäure und demjenigen eines Gens der HMGI(Y)-Familie, bestehen. Eine andere Form der Wechselwirkung kann darin bestehen, daß diese durch eine weitere Komponente vermittelt wird, d.h. keine direkte Wechselwirkung der beiden Genprodukt-Spezies vorliegt. Diese vermittelnde weitere Komponente kann bspw. eine Nukleinsäure sein, und insbesondere eine solche Nukleinsäure, die eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie aufweist, wie sie oben beschrieben wurde.

Infolge dieses Zusammenwirkens von Genprodukten der Gene der HMGI(Y)-Familie mit Nukleinsäure von transformierenden Viren, insbesondere den regulatorischen Regionen der Nukleinsäure (z.B. Promotoren und Enhancer) dieser Viren, kann der Entstehung von Gewebeveränderungen mit Gewebe mesenchymalen Ursprungs, wie sie beispielhaft in Tabelle 1 oben angegeben sind, dadurch entgegengewirkt werden, daß ein antivirales Mittel gegen die Viren verwendet wird. Wie vorstehend ausgeführt, sind allgemein derartige antivirale Mittel zu diesem Zweck geeignet, die gegen die an der Gewebeveränderung kausal beteiligten Viren gerichtet, d. h. aktiv sind. Die Viren sind die hierin beschriebenen Viren. Eine – bevorzugte – Untergruppe der hierin beschriebenen Viren sind solche Viren, bei denen das einzelne Virus eine Nukleinsäure aufweist bzw. für diese codiert, die mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt oder die für ein Genprodukt codiert, wobei das Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt, und die zur Gruppe der DNA-Viren gehören.

Im Zusammenhang damit scheinen innerhalb der Gruppe der DNA-Viren insbesondere die Adenoviren hierfür von besonderer Bedeutung zu sein. Eine weitere Gruppe von DNA-Viren, die für die hierin beschriebenen Gewebeveränderungen, die ein Gewebe umfassen, das mesenchymalen Ursprungs ist, von besonderer Bedeutung sind, sind Viren der Herpesgruppe, die im folgenden vereinfacht als Herpesviren bezeichnet werden. Des Weiteren gehören zur Gruppe der DNA-Viren, die für die hierin beschriebenen Gewebeveränderungen von Bedeutung sind, die Papova-Viren. Der vorliegenden Erfindung liegt weiterhin die Erkenntnis zugrunde, daß für die hierin beschriebenen Gewebeveränderungen verschiedene Viren, insbesondere DNA-Viren, synergistisch wirken können.

Unter Adenovirus soll hierin ganz allgemein ein jegliches Mitglied der Gruppe der Adenoviren verstanden werden, wie sie bspw. beschrieben ist in Fields Virology, 3rd Edition, Raven Publisher, Philadelphia, 1996 und das die dort beschriebenen Eigenschaften aufweist. Gleichermaßen gilt für die Viren aus der Gruppe der Herpesviren, d. h. unter Herpesvirus soll hierin ganz allgemein ein jegliches Virus aus der Gruppe der Herpesviren verstanden werden, z. B. auch das Cytomegalovirus, wie in Fields Virology, a.a.O., beschrieben und das die dort beschriebenen Eigenschaften aufweist. Des Weiteren erstreckt sich der Begriff der Adenoviren und/oder Herpesviren hierin insbesondere im Zusammenhang mit dem gegen Adenoviren und/oder Herpesviren gerichteten Impfstoff, auch auf solche Viren, die wesentliche Elemente und/oder Eigenschaften dieser Viren aufweisen. Hierzu zählen bspw. auch gentechnologisch veränderte Viren.

Zur Gruppe der DNA-Viren gehören auch die Polyoma-Viren, die wiederum zur Familie der Papovaviridae, zu denen auch die Papilloma-Viren und Simian Vacuolating Virus 40 (SV 40) gehören. Die Familie zeichnet sich durch extreme Hitzestabilität aus. Papovaviridae sind hüllelose kubische DNA-Viren mit einem Durchmesser von 45 bis 55 nm, umfassend 72 Kap- somere sowie eine zyklische doppelsträngige DNA. Das hierin insbesondere zu bzw. im Zusammenhang mit Adenoviren und Herpesviren Gesagte gilt sinngemäß auch für diese Gruppe der DNA-Viren.

Die erfindungsgemäßen antiviralen Mittel, die gegen die hierin beschriebenen Viren gerichtet bzw. wirksam sind, zu denen auch gegen diese Viren gerichtete Impfstoffe gehören, verhindern somit, daß die entsprechenden Gewebe, viral infiziert werden bzw. es zu einer Vermehrung des viralen Materials kommt und somit die Ausbildung des Komplexes aus viraler Nukleinsäure und Genprodukten der Gene der HMGI(Y)-Familie verhindert wird, was in der Folge dazu führt, daß die Ausbildung der Gewebeveränderungen unterbleibt.

Bei der Pathogenese der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen scheint weiterhin eine Bindung von Genprodukten viraler Nukleinsäure mit Genprodukten von Genen der HMGI(Y)-Familie und deren Derivaten zu erfolgen und infolge dessen sich der Einfluß der viralen transformierenden Proteine zu erhöhen. Infolge der verschiedenen antiviralen Mittel wird dieses Zusammenwirken letztendlich verhindert oder zumindest verringert.

Hierin soll Bindung eines Genprodukts von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivaten an virale Nukleinsäure oder an das Genprodukt viraler Nukleinsäure, insbesondere eine jegliche Wechselwirkung der daran beteiligten Molekülspezies umfassen, die dazu führt, daß die den Komplex ausbildenden Komponenten nicht mehr als Einzelkomponenten wahrgenommen werden, sondern der Komplex die einzige wahrnehmbare Komponente ist, was jedoch nicht ausschließt, daß Einzelkomponenten noch in nicht-gebundener Form vorhanden sind. Eine derartige Bindung schließt bspw. Wechselwirkung durch elektrostatische Anziehungskräfte, van der Waals-Kräfte, hydrophobe Wechselwirkung, Wasserstoffbrückenbindungen und Disulfidbrücken und Kombinationen davon ein. Ein derartiger Komplex umfaßt zumindest die beiden Genproduktespecies, d.h. ein Genprodukt der viralen Nukleinsäure und ein Genprodukt der Gene der HMGI(Y)-Familie, die direkt miteinander wechselwirken können, kann aber auch zusätzlich eine Nukleinsäure umfassen, wobei auch in diesem Fall eine direkte Wechselwirkung der beiden Genproduktespecies erfolgen kann, jedoch nicht notwendigerweise erfolgen muß.

Insoweit betrifft ein Aspekt der Erfindung auch einen Impfstoff gegen transformierende Viren, der zur Prävention und/oder Behandlung der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen geeignet ist. 27

Grundsätzlich sind alle der hierin offenbarten Mittel sowohl zur Therapie als auch zur Prävention von Gewebeveränderungen der hierin beschriebenen Art geeignet. Ganz besonders vorteilhaft für die Prävention sind dabei solche Mittel, die einen Impfstoff gegen die hierin beschriebenen Viren umfassen, die somit die bisherigen unbefriedigenden Therapie- und Präventionskonzepte mit ihren nicht unerheblichem Gefährdungspotential obsolet machen. Dabei ist besonders beachtlich, daß die Verwendung von Impfstoffen für den Körper besonders schonend, da mit in der Regel vergleichsweise weniger Nebenwirkungen verbunden, ist.

Die Herstellung von Impfstoffen gegen Viren ist in der Technik allgemein bekannt und bspw. beschrieben in Modrow, S.; Falke, D.; Molekulare Virologie, Spektrum, Akad. Verl., 1997.

Bei Impfstoffen sind grundsätzlich verschiedene Arten bekannt, nämlich Lebendimpfstoffe, die vermehrungsfähiges Virus enthalten, Impfstoffe aus inaktiviertem Virus, wobei die Viren in nicht mehr vermehrungsfähiger Form vorliegen, Spaltimpfstoffe, die nur aus den für die Immunisierung wichtigen Komponenten des Virus bestehen, auch als Subunit-Vakzine oder Antigenimpfstoffe bezeichnet, und sogenannte „synthetische Antigenimpfstoffe“. Alle vorerwähnten Impfstoffformen können im Rahmen der vorliegenden Erfindung verwendet werden.

Lebendimpfstoffe enthalten vermehrungsfähige Virusstämme, die einen spezifischen Schutz bewirken, aber bei gesunden Tieren zu keiner Erkrankung führen. Ein Lebendimpfstoff kann entweder aus homologen (artgleichen) oder heterologen (artfremden) Virusstämmen hergestellt werden. Als homologe Impfstoffe können natürlich gewonnene oder künstlich hergestellte Stämme eines Virus verwendet werden.

Natürlich gewonnene Impfvirusstämme stammen von Feldstämme ab, die nur noch eine schwache bzw. keine Virulenz mehr besitzen, also bei gesunden Tieren keine Erkrankung

mehr hervorrufen, sich aber im Wirt vermehren und die Ausbildung einer Immunität bewirken.

Eine Untergruppe der Lebendimpfstoffe betrifft die künstlich abgeschwächten, attenuierten Stämme. Sie werden aus gut immunisierenden, vollvirulenten Feldviren dadurch gewonnen, daß sie nach einer mehr oder weniger großen Anzahl von Passagen, bevorzugt in Zellkulturen, künstlich kultiviert werden, wodurch sie ihre Virulenz für den natürlichen Wirt verlieren. Der Virulenzverlust in einer derartigen passierten Viruspopulation tritt nicht gleichzeitig bei allen Viruspartikeln ein. Durch bestimmte Selektionsverfahren kann man aber attenuierte Viruspartikel isoliert gewinnen (z. B. Plaque-Methode, Endverdünnungsmethode usw.).

Unter Attenuierung versteht man eine gezielte Abschwächung oder Aufhebung der Virulenz eines vermehrungsfähigen Virus für einen bestimmten Wirt unter Erhaltung der Vermehrungsfähigkeit, der Antigenität und der Immunogenität, die über eine bestimmte Generationsfolge konstant bleibt.

Die Attenuierung kann eine Modifikation oder eine Mutation hinsichtlich Verlust der krankmachenden Eigenschaften, hier im vorliegenden Falle insbesondere hinsichtlich der transformierenden Eigenschaften, sein. Sie ist entsprechend mehr oder weniger stabil. Während man in früherer Zeit für eine künstliche Virulenzabschwächung vorwiegend Passagen in Tieren oder Bruteiern durchführte, gewinnt man heute attenuierte Stämme hauptsächlich aus Zellkulturen über Dauerpassagen.

Lebendvakzine aus heterologen Virusstämmen können dann einen Immunschutz bewirken, wenn zwischen artverschiedenen Viren sehr enge immunologische Verwandtschaftsbeziehungen bestehen. Man kann dann als Impfstamm den verwandten heterologen und deshalb nicht krankmachenden Virusstamm verwenden.

Lebendvakzine haben Vor- und Nachteile. Durchschnittlich wird mit ihnen eine bessere und länger anhaltende Immunität erzielt. Ein gut attenuiertes Impfvirus kann den Immunitätsme-

chanismus nur dann stimulieren, wenn es in ausreichender Konzentration verabreicht wird. Die Bestimmung einer entsprechenden ausreichenden Konzentration kann durch einfache routinemäßige Versuche erfolgen, die im Rahmen des Könnens des Durchschnittsfachmanns liegen. Der Impfschutz setzt in der Regel schon nach wenigen Tagen nach der Impfung ein. Verantwortlich sind hierfür mehrere Vorgänge: Interferenz, Interferon-Bildung, schnelle Entwicklung einer zellulären Immunität. Ein weiterer Vorteil von Lebendvakzinen besteht darin, daß sie sehr leicht lokal appliziert werden können, z. B. oral oder per Aerosol. Dies ist besonders mit Blick auf die vergleichsweise leichte Zugänglichkeit der betroffenen Gewebe bzw. Organe im Falle der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen vorteilhaft, da in einem solchen Fall der Endverbraucher ein entsprechendes Mittel selbst anwenden kann.

Weiterhin können gemäß der vorliegenden Erfindung Impfstoffe aus inaktivierten Viren verwendet werden. Als Virusinaktivierung wird generell die Aufhebung der Infektiosität eines Virusteilchens bezeichnet. In der Impfstoffherstellung speziell versteht man unter Inaktivierung, daß Viren künstlich, mit chemisch-physikalischen Verfahren, die Vermehrungsfähigkeit genommen wird, ohne daß dabei die anderen Aktivitäten, insbesondere die antigenen und immunogenen Fähigkeit negativ beeinflußt werden. Für Impfstoffe aus inaktivierten Viren findet sich in der Literatur teilweise noch der Begriff „antiger Impfstoff“.

Als Ausgangsmaterial für diese Impfstoffe dienen aus virushaltigen Organen oder Geweben, heute jedoch in erster Linie aus Zellkulturen hergestellte, gereinigte und hochkonzentrierte Virussuspensionen von vollvirulenten gut immunisierenden Virusstämmen. Diese konzentrierten Virussuspensionen werden dann schonend durch geeignete Verfahren inaktiviert. Optimal sind chemische oder physikalische Behandlungen, die die Virusnukleinsäure als Träger der Vermehrungsfähigkeit und Infektiosität zerstören, jedoch die Proteinanteile des Virus, die wirksame Komponenten für Antigenität und Immunogenität sind, möglichst wenig schädigen, denaturieren oder verändern. Bewährte Mittel sind z. B. Formaldehyd und bestimmte Detergenzien. Als physikalische Komponenten verwendet man Wärme und Strahlen.

Weiterhin können im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung Spaltimpfstoffe verwendet werden, die durch Aufspaltung von Viren gewonnene antigene und immunisierende Viruskomponenten in, in der Regel, gereinigter Form enthalten.

Bei den behüllten Viren sind dies die virusspezifischen Glycoproteide der lipidhaltigen Hüllen. Spezifische Antikörper gegen diese Antigene binden in vivo an die Glycoproteide des Virus, blockieren dadurch deren Haftungsfunktion an die Zellen und damit die Infektiosität.

Die immunisierenden Glycoproteide behüllter Viren kann man durch die chemische Aufspaltung der Virushülle (bestimmte lipidlösende Detergenzien) freisetzen. Das Virus verliert dadurch spontan und restlos seine infektiösen Eigenschaften und anschließend wird das gewünschte Glycoproteid von unerwünschten Komponenten wie Nukleoprotein, Kapsidenzym, Lipide etc. des aufgespaltenen Virusmaterials durch physikalisch-chemische Verfahren gereinigt, konzentriert und zum Impfstoff verarbeitet.

Bei unbehüllten, nackten Viren sind Spaltimpfstoffe aus den für die Immunisierung maßgeblichen Kapsidproteinen von den Fachleuten auf dem Gebiet entwickelbar.

Schließlich können auch synthetische antigene Impfstoffe verwendet werden, die mittels gentechnologischer Verfahren hergestellt werden. Über Isolierung und Identifizierung der maßgeblichen Gene des Virusgenoms kann beispielsweise das Kapsidprotein der entsprechenden Viren gentechnologisch produziert werden. Dabei ist es im Rahmen der Fähigkeiten des Fachmannes die entsprechende Nukleinsäure bzw. daraus resultierenden Proteine soweit zu verkürzen, daß lediglich die antigene Determinante bzw. das entsprechende Epitop als Impfstoffkomponente verbleibt. In diesem Sinne ist auch die erfindungsgemäße Vorrichtung zu verwenden. Die an das mit Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie versehene Trägermaterial gebundene virale Nukleinsäure kann, in der Regel nach Elution, dazu verwendet werden, zu bestimmen welches Virus, bzw. dessen Nukleinsäure, an der Ausbildung des für die Entstehung der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen verantwortlichen Komplexes aus viraler Nukleinsäure und Genprodukt eines Gens der HMGI(Y)-Familie beteiligt ist.

Nach dieser Identifizierung kann die erfindungsgemäße Vorrichtung aber auch für die Bereitstellung einer für die Herstellung eines erfindungsgemäßen Mittels zur Prävention und/oder Behandlung der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen wesentliche Komponente verwendet werden. Dabei wird eine virale Nukleinsäure oder ein Pool viraler Nukleinsäuren zu der erfindungsgemäßen Vorrichtung gegeben, woraufhin diejenige virale Nukleinsäure an die Vorrichtung bzw. an das in dieser an ein Trägermaterial gebundene Genprodukt eines Gens der HMGI(Y)-Familie bindet, die mindestens eine Bindungsstelle für das Genprodukt eines Gens der HMGI(Y)-Familie aufweist. Nicht gebundene oder unspezifisch gebundene virale Nukleinsäure wird entfernt, beispielsweise durch Waschen des Trägermaterials mit einer geeigneten Waschlösung. Anschließend wird die spezifisch gebundene virale Nukleinsäure vom Trägermaterial eluiert. Die solchermaßen erhaltene Nukleinsäure kann dann verwendet werden, um einen viralen Bestandteil zu bilden, der in den erfindungsgemäßen Mitteln verwendet wird. Beispielsweise kann die virale Nukleinsäure in einen Expressionsvektor kloniert werden und das exprimierte virale Peptid oder Protein als Impfstoff verwendet werden. Alternativ kann beispielsweise das solchermaßen exprimierte virale Peptid oder Protein, möglicherweise nach weiteren Zwischenschritten, die den Fachleuten bekannt sind, zur Herstellung von Antikörpern verwendet werden, die dann ihrerseits als Impfstoff in den erfindungsgemäßen Mitteln verwendet werden können. Im Zusammenhang damit ist das exprimierte virale Peptid oder Protein bzw. der dagegen gerichtete Antikörper die für die Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen wesentliche Komponente.

Gleiches gilt auch für den Fall der Bindung eines Genproduktes der viralen Nukleinsäure an ein Genprodukt eines Gens der HMGI(Y)-Familie. In diesem Fall werden anstelle der viralen Nukleinsäure die Produkte viraler Nukleinsäure, insbesondere Nukleinsäure von Kandidatenviren, d.h. solchen Viren, die mutmaßlich an der - kausalen - Entstehung der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen beteiligt sind, hinzugegeben. Die nach spezifischer Bindung und anschließender Elution erhaltenen, von viralen Nukleinsäure codierten Genprodukte können sodann direkt als Impfstoff verwendet werden oder weiteren Modifikation oder weiteren Bearbeitungsschritten unterworfen werden. Dabei kann auch vorgesehen sein, daß die

Impfstoffe weiter gereinigt werden oder mit entsprechenden Adjuvanzien versetzt oder für die angestrebte Verwendung in geeigneter Weise behandelt oder zubereitet werden werden.

Den Impfstoffen können Adjuvanzien hinzugesetzt werden, wie bspw. vollständiges oder unvollständiges Freundsches Adjuvans. Weitere Zusätze sind den Fachleuten auf diesem Gebiet bekannt.

Allgemein können die erfindungsgemäßen Mittel als pharmazeutisches Präparat vorliegen, das neben mindestens einem der verschiedenen erfindungsgemäßen Mittel auch einen geeigneten pharmazeutisch akzeptablen Träger umfaßt. Geeignete pharmazeutisch akzeptable Träger sind den Fachleuten bekannt.

Die erfindungsgemäßen Mittel können weitere Zusätze, die bspw. der Stabilisierung des Mittels, der Konservierung, der Modifikation der Eigenschaften des Mittels selbst dienen, sowie Stoffe, die die Eigenschaften der erfindungsgemäßen Mittel modifizieren, umfassen.

Derartige Stoffe, die die Eigenschaften des erfindungsgemäßen Mittels selbst modifizieren, können bspw. im Falle von Impfstoffen Adjuvanzien, wie bspw. unvollständiges oder vollständiges Freundsches Adjuvans, sein.

Die erfindungsgemäßen Mittel können weiterhin Komponenten aufweisen, die sie in eine für die jeweilige angestrebte Applikationsform bevorzugte Form überführen. So kann z. B. im Falle der Ausbildung der erfindungsgemäßen Mittel als Aerosole neben dem eigentlichen Mittel ein für die Aerosolbildung erforderliches Trägermaterial vorgesehen sein.

Das erfindungsgemäße Mittel kann bspw. in Form einer Lösung oder Emulsion zur-intradermalen, intravenösen oder subkutanen Injektion vorliegen. Flüssige Lösungen der erfindungsgemäßen Mittel können auch in infundierbarer Form vorliegen.

Weiterhin können die erfindungsgemäßen Mittel in lyophilisierter Form vorliegen.

Darüberhinaus können die erfindungsgemäßen Mittel grundsätzlich in einer jeglichen pharmazeutisch geeigneten Form vorliegen, einschließlich, bspw., Tabletten, Dragees, Suppositorien, Gele, Pulver.

Für den Fall, daß das Mittel einen Impfstoff umfaßt, kann der Impfstoff selbst ein vollständiges Viruspartikel sein, lebend oder attenuiert, ebenso wie inaktiviert oder Teile davon, wobei die Teile davon typischerweise die antigenen und immunologischen Eigenschaften des jeweiligen Virus tragen. Es kann dabei vorgesehen sein, daß der Impfstoff eine Vielzahl verschiedener Viruspartikel oder antigener bzw. immunogen-wirksamer Teile umfaßt. Die Viruspartikel sowie die Teile können selbst in modifizierter Form vorliegen. Derartige Modifikationen können ausgebildet sein durch, wie dies allgemein für Peptide, Proteine, die ggf. glycosyliert sind, bekannt ist.

Die Viruspartikel oder Teile davon können gentechnologisch hergestellt sein. Es ist nicht erforderlich, daß die Viruspartikel oder Teile davon mit den für die Entstehung der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen verantwortlichen oder zumindest damit assoziierten Viren identisch ist. Entscheidend ist, daß die im Impfstoff verwendeten oder zu dessen Herstellung verwendeten Viren, einschließlich Teile davon, geeignet sind, eine gegen das für die Erkrankung kausale Agens, d.h. Virus, gerichtete Immunantwort zu erzeugen und somit die transformierenden Eigenschaften des an der Pathogenese beteiligten Agens bzw. Virus zu verhindern.

Das vorstehend gesagte gilt sinngemäß auch für den Fall, daß der Impfstoff einen Antikörper umfaßt.

Man hat gefunden, daß die Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate auf der Nukleinsäure des Virus eine Reihe von Struktur- und Sequenzmerkmalen umfaßt. Grundsätzlich scheint für die Bindung von Genprodukten der HMGI(Y)-Familie, Teilen davon und deren Derivaten, das Vorhandensein einer - ersten - AT-reichen Sequenz von Bedeutung zu sein. Dabei ist AT-reiche Sequenz nicht so zu verstehen,

daß dies eine ausschließliche Abfolge bestehend aus AT-Dimeren ausbildet. Vielmehr kann diese Sequenz eine beliebige Reihenfolge der beiden Basen umfassen, die durch einzelne oder mehrere Nukleotide unterbrochen sein kann. Neben diesem ersten Struktur- und Sequenzmerkmal weisen die besagten Bindungsstellen der Genprodukte der HMGI(Y)-Familie noch eine zweite AT-reiche Sequenz auf, die ähnlich ausgebildet sein kann wie die erste AT-reiche Sequenz. Beide AT-reiche Sequenzen sind in einer räumlichen Distanz relativ zueinander angeordnet. Diese räumliche Distanz ergibt sich aus den räumlichen Abmessungen und damit aus der Sekundär- und Tertiärstruktur der HMGI(Y)-Proteine, d.h. der Genprodukte der Gene der HMGI(Y)-Familie. Infolge dieser Sekundär- und Tertiärstruktur ist für ein Binden des HMGI(Y)-Genproduktes erforderlich, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der viralen Nukleinsäure angeordnet sind. Betrachtet man die DNA als dreidimensionales Modell, so liegen bei der vorgeschilderten Anordnung die als Bindungsstellen wirkenden AT-reichen Sequenzen auf der dem Betrachter jeweils zugewandten Seite. Diese Anordnung wird auch als „same face“ bezeichnet. Liegen diese drei Struktur- bzw. Sequenzmerkmale der viralen Nukleinsäure vor, kommt es zu einem besonders nachhaltigen Binden des Genprodukts an die virale Sequenz, insbesondere in regulatorischen Regionen der Nukleinsäure (z.B. Promotoren und Enhancer), da bevorzugt diese die besagten Struktur- und Sequenzmerkmale aufweist. Fehlt eines oder mehrere dieser Sequenz- bzw. Strukturmerkmale, wird die Bindung eines Genproduktes der Gene der HMGI(Y)-Familie nur schwach oder gar nicht erfolgen.

Betrachtet man umgekehrt die Sekundär- bzw. Tertiärstruktur der Genprodukte der Gene der HMGI(Y)-Familie, so existieren dort drei Bereiche, oder Domänen, die in einer definierten Entfernung voneinander angeordnet sind, die zu AT-reichen Sequenzen eine – hohe – Affinität aufweisen. Eine erfolgreiche Bindung an eine Nukleinsäure setzt somit voraus, daß die AT-reichen Sequenzen in einer hierzu korrespondierenden Entfernung angeordnet sind. Diese Entfernung resultiert aus der Ganghöhe der Nukleinsäure, die in der Regel ca. 10 Basenpaare beträgt, woraus resultiert, daß der Abstand der AT-reichen Sequenzen in der Regel 10 Basenpaare sowie ganzzahlige Vielfache bis zu ≤ 3 davon beträgt.

Gemäß der vorliegenden Erfindung sind neben Impfstoffen allgemein, besonders solche Impfstoffe gegen die hierin beschriebenen Viren, solche Impfstoffe für die erfindungsgemäßen Mittel geeignet, die gegen ein vorstehend genanntes Virus gerichtet sind, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für mindestens ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate aufweist. Gene der HMGI(Y)-Familie sind in der Technik gut bekannt. Die Gene der HMGI(Y)-Familie stellen eine Familie von Genen dar, die, unter anderem, HMGIC, HMGIV und MAG-Gene umfaßt. Beispielhaft sei hierzu auf die internationale Patentanmeldung PCT/EP96/00716 und PCT/DE96/02494 beschrieben, deren Offenbarungsgehalt hierin durch Bezugnahme aufgenommen wird. Beachtlich ist, daß die Bindungsstelle auf der viralen Nukleinsäure für ein beliebiges der vorstehend genannten Gene bzw. dessen Genprodukt geeignet ist. Hierin soll der Begriff Genprodukt auch Teile davon bezeichnen, solange diese Teile noch geeignet sind, eine virale Nukleinsäure zu binden. Gleichfalls soll der Begriff Genprodukt die jeweiligen Derivate des Genproduktes umfaßt, die eine Modifikation aufweisen, wie sie üblicherweise für Peptide und Proteine vorgenommen werden kann, und bspw. Deletionen und Austausche der carboxyterminalen Abschnitte der Proteine umfaßt. Insbesondere umfaßt der Begriff Derivate der Gene der HMGI(Y)-Familie auch die in PCT/DE96/02494 beschriebenen aberranten Transkripte sowie deren Translationsprodukte, solange diese nach wie vor in der Lage sind, an die virale Nukleinsäure, insbesondere in regulatorischen Regionen der Nukleinsäure (z.B. Promotoren und Enhancer) derselben, zu binden. Die Charakterisierung derartiger aberranter Transkripte ist bspw. beschrieben von Kazmierczak, B. et al; Am. J. Pathol., 1998; 153(2):431-5 und deren Struktur bspw. von Schoenmakers, E. F. et al, aaO.

In einer alternativen Ausführungsform der erfindungsgemäßen Mittel kann vorgesehen sein, daß der Impfstoff ein Antikörper ist, der gegen das Virus gerichtet ist. Es ist dabei ausreichend, wenn der Antikörper nicht primär gegen das Virus oder einen entsprechenden Teil davon gerichtet ist, sondern mittels einer entsprechenden Kreuzreaktivität seine Wirkung erfüllt und entsprechend gewährleistet, daß es zu keiner Wechselwirkung zwischen der viralen Nukleinsäure mit dem Genprodukt der Gene der HMGI(Y)-Familie kommt. Dabei kann vorgesehen sein, daß der Antikörper gegen eine jede beliebige Komponente des Virus ge-

richtet ist, d.h. er kann gerichtet sein gegen bzw. wechselwirken mit Proteinen oder Protein-fragmenten des Viruskapsids, des gegebenenfalls vorhanden Glycopeptids oder aber auch mit der entsprechenden viralen Nukleinsäure bzw. Fragmenten davon.

Der Antikörper, wie er im Rahmen der Erfindung verwendet wird, kann sein ein monoklonaler Antikörper oder polyklonaler Antikörper. Der Begriff Antikörper kann hierin eine Mischung verschiedener monoklonaler Antikörper umfassen. Weiterhin soll hierin der Begriff Antikörper ein jegliches Peptid oder Protein umfassen, welches mindestens eine Antikörpereigenschaft aufweist, insbesondere an ein geeignetes Epitop bindet und dafür sorgt, daß der Komplex aus Antikörper plus Epitop bzw. Antigen in einer für die Pathogenese der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen nicht mehr zugängliche Form überführt wird bzw. aus dem Pathogeneseprozess entfernt wird. Dies kann bspw. dadurch erfolgen, daß eine Wechselwirkung eines Genproduktes eines Gens der HMGI(Y)-Familie mit der viralen Nukleinsäure oder eine solche mit einem Genprodukt einer viralen Nukleinsäure (wobei das entsprechende Virus - kausal - an der Entstehung der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen beteiligt ist) letztenendes vermieden wird, wobei diese Verhinderung sowohl direkt als auch indirekt bedingt werden kann, indirekt bspw. durch Entfernen der entsprechenden Viren bzw. Virenpartikel. Der Begriff Antikörper schließt auch Antikörperfragmente und deren Derivate ein, so insbesondere (Fab)' oder F(ab)₂-Fragmente sowie Einzelketten-Antikörper und dgl. Derivate dieser Antikörper sind den Fachleuten ebenfalls bekannt und schließen insbesondere ein.

Das vorstehend Gesagte gilt sinngemäß auch für den Fall, daß ein Impfstoff gegen ein Virus vorgesehen ist, dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt.

Die Viren, gegen die ein Impfstoff bzw. ein Antikörper in den erfindungsgemäßen Mittel enthalten ist, gehören zu den verschiedenen Gruppen der hierin beschriebenen Viren mit ihren verschiedenen Typen.

Bei der erfindungsgemäßen Verwendung des erfindungsgemäßen Mittels zur Immunisierung, und insbesondere aktiven Immunisierung, gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen verbunden sind, sind bevorzugt die Viren jene, die kausal mit der Pathogenese/Ätiologie der hierin beschriebenen Gewebeveränderungen verbunden bzw. assoziiert sind.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren werden Zellkulturen verwendet, die abgeleitet sind von einer Gewebeveränderung bzw. Teilen des/der sie aufbauenden Gewebes/Gewebe. Die Herstellung derartiger Zellkulturen ist den Fachleuten bekannt und ist bspw. beschrieben in Stern, C. et al.; Geburtsh. u. Frauenheilk. 52 (1992), 767-772.

Unter normalem Karyotyp soll hierin verstanden werden der Chromosomensatz, wie er nach Anwendung routinemäßiger Techniken erhalten wird, sofern er bei einer Darstellung von \geq 500 Banden pro haploidem Satz keine erkennbaren Anomalien insbesondere der Bereiche 12q14-15 und 6p21 aufweist.

Ein Expressionsvektor für ein Gen der HMGI(Y)-Familie zeichnet sich dadurch aus, daß er in seiner Gesamtheit zur Expression eines Gens der HMGI(Y)-Familie führt und damit zur Herstellung entsprechender Genprodukte. Typischerweise umfaßt ein derartiger Expressionsvektor einen Replikationsursprung, die für ein Genprodukt der HMGI(Y)-Genfamilie oder Fragment davon kodierende Nukleinsäure, und geeignete transkriptions- und translationsregulierende Sequenzen. Derartige Konstrukte sind in der Technik bekannt und bspw. beschrieben in Winnacker, E.-L.; From Genes to Clones; Weinheim; New York: VCH, 1987.

Prinzipiell ist ein jegliches Transfektionsverfahren im Rahmen der vorliegenden Erfindung anwendbar, welches zu einer Transfektion der entsprechenden Zellkulturen führt.

Die Herstellung von cDNA ist den Fachleuten bekannt. Für den Vergleich des RNA- bzw. cDNA-Musters der transfizierten Zellen bzw. Kulturen mit demjenigen von nicht-transfizierten Zellen bzw. Kulturen wird typischerweise so vorgegangen, wie unter der Me-

thode des sogenannten „differential display“ verstanden (Diatchenko, L.; Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Vol. 93, S. 6025-6030, 1996).

Bei der Überprüfung von in den transfizierten Kulturen gegenüber Kontrollkulturen exprimierten oder verstärkt exprimierten RNA(s) durch Sequenzhomologie auf das Vorhandensein viraler Elemente wird typischerweise so vorgegangen, daß die Sequenz unter Zuhilfenahme von einschlägigen Datenbanken, z.B. BLAST, ein Datenbankservice des National Center for Biotechnology Information (NCBI), überprüft bzw. gegebenenfalls identifiziert werden.

Es ist im Rahmen des erfindungsgemäßen Verfahrens, daß auch von den primären Transkriptionsprodukten abgeleitete Nukleinsäuren für den Vergleich des RNA-Musters der transfizierten Kulturen mit demjenigen von Kontrollkulturen herangezogen werden können. Entsprechend ist es möglich, diesen Vergleich auf der Grundlage des cDNA-Musters anzustellen, wobei die cDNA von den Transkriptionsprodukten, d.h. den RNA-Spezies, hergestellt wurde unter Verwendung von bekannten Verfahren.

Die Kontrollkulturen sind in der Regel jene mit normalem Karyotyp, die abgeleitet sind von einem Gewebe oder Teil eines Gewebes, welches in einer hierin beschriebenen Gewebeveränderung enthalten ist, und welche mit einem Expressionsvektor transfiziert sind, dem jedoch das Gen der HMGI(Y)-Familie oder dessen Derivat, d.h. das für ein Genprodukt codierende Insert, fehlt. Kontrollkulturen können aber auch solche sein, die mit keinerlei Expressionsvektor transfiziert sind.

Bei einem weiteren erfindungsgemäßen Verfahren, bei dem die Durchführung eines PCR-Tests vorgesehen ist, wobei die für die PCR-verwendete Sonde eine virale Sonde ist, erfolgt der PCR-Test nach den in der Technik bekannten Verfahren. Unter PCR-Test wird ein Polymerase-Kettenreaktions-Test verstanden, bei dem mindestens ein sequenzspezifischer Primer zur selektiven Amplifikation der gesuchten Nukleinsäure(fragmente) verwendet wird. (siehe Newton, C.R.; Graham, A.; „PCR“; 1994, Spektrum Akadem. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford.

Unter Primer oder viraler Sonde sollen hierin Oligonukleotide und/oder Nukleinsäurefragmente verstanden werden, die gerichtet sind auf eine Detektion von Nukleinsäuren, die eine Homologie zu dem Primer/der Sonde aufweisen. Die Herstellung derartige viraler Sonden kann auf allen den Fachleuten bekannte Wegen erfolgen, so bspw. durch organische chemische Synthese oder unter Verwendung von PCR oder Klonierungstechniken.

Wird im Rahmen eines erfindungsgemäßen Verfahrens eine cDNA-Bibliothek von einer Gewebeveränderung, wie sie hierin beschrieben ist, oder eines Teils davon angelegt, die/der eine Aktivierung eines Gens der HMGI(Y)-Familie oder eines Derivates aufweist, so kann die Aktivierung durch eine entsprechende Chromosomenaberration kenntlich sein.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren wird das Screenen typischerweise unter Bedingungen niedriger Stringenz vorgenommen. Unter Bedingungen niedriger Stringenz soll dabei verstanden werden, daß durch Herabsetzen bspw. der Hybridisierungstemperatur oder Modifikation der Waschbedingungen (z.B. Erhöhung der Salzkonzentration) auch eine Bindung an solche Nukleinsäuren erfolgt, deren Homologie zu der Sequenz der Sonde deutlich reduziert ist, wobei zunächst auch eine Erfassung falsch-positiver Nukleinsäuresequenzen in Kauf genommen wird, da eine letztendliche Klärung ob es sich um ein positives Signal bzw. Ergebnis handelt, durch Sequenzierung und Sequenzanalyse der identifizierten Sequenzen erfolgt und somit eine Ausscheidung der falsch-positiven Sequenzen zuläßt.

Bei den erfindungsgemäßen Verfahren kann, nachdem durch einen Vergleich des RNA – oder cDNA – Musters von transfizierten Zellkulturen mit dem von Kontrollkulturen, oder durch ein positives Signal in einem PCR-Test unter Verwendung von Primer(paaren), die Sequenzen viraler Nukleinsäuren entsprechen, oder durch ein positives Signal beim Screenen einer cDNA-Bibliothek mit einer viruspezifischen Sonde, oder durch Analyse der cDNA-Klone auf virale Sequenzen oder Vergleich mit einer cDNA-Bibliothek aus normalem mesenchymal bzw. ggf. epithelialen Gewebe, festgestellt wurde, daß virale Elemente in den hierin beschriebenen Gewebeveränderungen bzw. den davon abgeleiteten Zellkulturen vorhanden

sind, weiterhin vorgesehen sein, daß die viralen Elemente identifiziert und/oder klassifiziert und ausschließlich für die Impfstoffherstellung verwendet werden.

Die erfindungsgemäßen Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese beteiligten Virus umfaßt ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie, das an einen Träger gebunden ist. Im Zusammenhang mit der erfindungsgemäßen Vorrichtung sowie deren möglichen Verwendungen umfaßt der Begriff Genprodukt auch Teile der Genprodukte oder Derivate der Genprodukte. Dabei liegt der Definition von Genprodukten auch die oben gegebene Definition von Genen der HMGI(Y)-Familie zugrunde.

Das Genprodukt ist dabei an ein Trägermaterial gekoppelt, das vom Fachmann auf dem Gebiet entsprechend ausgewählt wird. Als Trägermaterialien eignen sich all jene Materialien, die eine Bindung von Proteinen oder Derivaten, sei es direkt oder indirekt erlauben. Geeignete Trägermaterialien finden sich typischerweise im Bereich der Chromatographiematerialien. Eine derartige Bindung kann auch eine Adsorption sein bzw. eine reversible Bindung. Da es sich bei den Genprodukten der HMGI(Y)-Familie um Proteine handelt, können die den Fachleuten auf dem Gebiet bekannten Verfahren und Verbindungen zur Immobilisierung von Proteinen verwendet werden.

Hinsichtlich der Gestaltung des/der an das Trägermaterial gebundenen Genproduktes bzw. Genprodukte ist im wesentlichen darauf zu achten, daß derjenige Bereich an das Trägermaterial gebunden ist bzw. für Bindung viraler Nukleinsäure zur Verfügung steht, der für das Binden an die virale Nukleinsäure verantwortlich ist. Insoweit kann das entsprechende Genprodukt verkürzt sein oder bspw. als Fusionsprotein zur Verfügung gestellt werden. Ein jegliches Konstrukt ist dabei denkbar, sofern der Nukleinsäure-bindende Teil des Genproduktes oder derjenige Teil des Genproduktes der Gene der HMGI(Y)-Familie, der für das Binden des Genproduktes der viralen Nukleinsäure verantwortlich ist, noch für eine Bindung einer Nukleinsäure zur Verfügung steht.

Im konkreten Fall kann eine derartige Vorrichtung so ausgebildet sein, daß es sich dabei um eine affinitätschromatographische Säule handelt, wobei an das Säulenmaterial entsprechend zumindest ein Genprodukt von Genen der HMG(Y)-Familie, sei es nun von einem Genprodukt oder verschiedenen Genprodukten, immobilisiert ist und verschiedenen Ansätzen oder auch Gemische von viraler Nukleinsäure oder von von viraler Nukleinsäure codiertem Genprodukt zur Trägermatrix hinzugegeben werden. Infolge der Wechselwirkung zwischen dem Genprodukt und der viralen Nukleinsäure bzw. dem Genprodukt der viralen Nukleinsäure kommt es zur Ausbildung eines stabilen Komplexes. Nicht spezifisch gebundene virale Nukleinsäure oder ungebundene Nukleinsäure bzw. nicht spezifisch gebundenes oder ungebundenes Genprodukt von viraler Nukleinsäure sowie weitere Bestandteile der aufgetragenen Probe werden von der Säule gewaschen. Durch einen geeigneten Elutionspuffer werden sodann – ggf. spezifisch – die Wechselwirkungen zwischen dem Genprodukt und der an das Genprodukt gebundenen viralen Nukleinsäure bzw. dem gebundenen Genprodukt der viralen Nukleinsäure verringert, so daß die entsprechenden viralen Nukleinsäuren oder die von diesen codierten Genprodukte eluiert und weiter analysiert werden können.

Die Erfindung wird anhand der folgenden Beispiele, experimentellen Befunde und Figuren weiter erläutert. Dabei zeigt

Fig. 1 die Größenverteilung der Myome mit normalem Karyotyp (graue Säulen) sowie mit 12q14-15-Aberrationen (schwarze Säulen);

Fig. 2 eine Übersicht der in Beispiel 4 verwendeten Vektoren;

Fig. 3a-c einen Sequenzvergleich verschiedener Sequenzen aus Myomgewebe mit adenoviralen Sequenzen;

Fig. 4a-b eine vergleichende Analyse verschiedener aus Myomgewebe erhaltener Sequenzen;

Fig. 5 HMG(Y)-Bindungsstellen in der Promotorsequenz des adenoviralen Proteins E1A; und

Fig. 6 das Ergebnis einer PCR-Analyse, mit der die Anwesenheit eines adenoviralen DNA-Fragmentes in verschiedenen Gewebeveränderungen untersucht wurde.

Beispiel 1

Die Ergebnisse bisheriger zytogenetischer Studien an Uterus-Myomen sind widersprüchlich bezüglich möglicher Korrelationen zwischen der Tumogröße und dem Auftreten klonaler Chromosomenaberrationen. Das Problem dieser Studien ist allerdings, daß die untersuchten Tumoren möglicherweise z. B. nach Größe selektiert sind. Da die Frage einer möglichen Korrelation aber auch damit zusammen hängt, ob die Chromosomenaberrationen sekundär auftreten und das Wachstumspotential der betroffenen Tumoren verstärken, wurde eine Studie an unselektierten Myomen durchgeführt. Untersucht wurden dabei nur Myome nach Hysterektomie, wobei alle Tumoren untersucht wurden, die durch Tastuntersuchung des operativ entfernten Uterus nachweisbar waren.

Insgesamt wurden 155 Myome von 96 Patientinnen zytogenetisch untersucht. Dabei zeigten 28% der Myome klonale Karyotypänderungen. Auf die drei Hauptkaryotypengruppen mit normalem Karyotyp, Aberrationen der Chromosomenregion 12q14-15 und Deletion des langen Arms von Chromosom 7 entfielen 72%, 12% und 8%. Die durchschnittliche Tumogröße für die Gruppen ist Tabelle 3 zu entnehmen.

Tab. 3: Durchschnittliche Myom-Größe in den drei Hauptkaryotyp-Gruppen mit 12q14-15-Aberrationen, Deletionen des langen Arms von Chromosomen 7 und normalem Karyotyp

Karyotyp-Gruppe	durchschnittliche Größe [cm] \pm Standardabweichung [cm]
-----------------	--

normaler Karyotyp	$3,4 \pm 2,1$
12q14-15 Aberrationen	$8,9 \pm 5,6$
Deletion des Chromosoms 7	$3,5 \pm 2,0$

Die Ergebnisse zeigen deutlich, daß das Auftreten von 12q14-15-Aberrationen, die molekulargenetisch mit Mutationen im oder im Bereich des HMGIC-Gens korrelieren, mit einer hochsignifikanten Größenzunahme der entsprechenden Myome einhergehen, wenn man sie entweder mit Myomen mit normalem Karyotyp oder mit Deletionen am langen Arm von Chromosom 7 vergleicht. Die Unterschiede werden nicht nur beim Vergleich der Mittelwerte, sondern auch der Verteilungen der Tumorgrößen der einzelnen Tumorgruppen, wie dargestellt in Fig.1, deutlich.

Zusammengefaßt führt offenkundig das Auftreten von Chromosomenaberrationen der Chromosomenregion 12q14-15, das mit der verstärkten Expression von HMGIC-Gen oder der Expression veränderter Transkripte dieses Gens einhergeht, zu einem verstärkten Tumorwachstum.

Beispiel 2

Mutationen im Bereich des HMGIC- oder HMGIY-Gens manifestieren sich zytogenetisch durch Chromosomenaberrationen der Region 12q14-15 bzw. 6p21. Zumindest theoretisch ist aber durchaus denkbar, daß die zytogenetisch erkennbaren Aberrationen nur „die Spitze des Eisberges“ darstellen und ein wesentlich größerer Teil der Mutationen der beiden genannten Gene mit zytogenetisch nicht darstellbaren chromosomalnen Umbauten einhergeht. Wäre dies der Fall, könnte es für eine Schlüsselrolle der genannten Aberrationen bei der Tumorentwicklung insgesamt im Sinne einer primären Mutation sprechen. Eine Methode zum Nachweis der „versteckten“ Umlagerungen ist die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH). Es wurde an einer Serie von 40 Myomen mit anscheinend normalem Karyotyp FISH-Experimente durchgeführt, für die Cosmid- und PAC-Sonden eingesetzt wurden, die den Lokalisierungsort von HMGIC- bzw. HMGIY-Gen abdecken. Die Sonden wurden dabei so ge-

wählt, daß ein Bereich von ca. 150 kb 5' bis 40 kb 3' vom HMGIC-Gen und von 30 kb 5' bis 40 kb 3' vom HMGY-Gen abgedeckt wurde. Alle Myome wurden mit den Sonden für beide Gene untersucht; analysiert wurden jeweils mindestens 20 Metaphasen. In keinem Fall ergaben sich Hinweise auf mit Mitteln der konventionellen Zytogenetik nicht erkennbare, verdeckte chromosomale Umlagerungen der untersuchten Bereiche.

Berücksichtigt man die Häufigkeit der Myome ohne erkennbare zytogenetische Veränderungen (s. Beispiel 1) und die Ergebnisse der in diesem Beispiel dargestellten Untersuchungen, ist es wahrscheinlich, daß die Mutationen der Gene der HMGI(Y)-Familie bei der Mehrzahl der Uterus-Myome keine Schlüsselrolle spielt.

Beispiel 3

Unabhängig davon, ob diese Veränderungen primär oder sekundär sind, wird als molekulargenetische Basis der 12q14-15- und 6p21-Aberrationen bei Uterus-Myomen angenommen, daß es durch die chromosomal Umlagerungen zu einer Expression/verstärkten Expression oder einer Expression aberranter Transkripte des HMGIC-Gens bzw. HMGY-Gens kommt, die in normalem Uterus-Gewebe fehlt. Für das HMGIC-Gen ist mittels einer RT-PCR in normalem Uterus-Gewebe im Regelfall keine HMGIC-Genexpression nachweisbar. Es wurden mit dieser Methode 40 Myomgewebe mit anscheinend normalem Karyotyp untersucht. Ziel der Untersuchung war wiederum festzustellen, ob bei diesen Myomen, wie bei solchen mit 12q14-15-Veränderungen, Hinweise auf eine HMGIC-Genexpression zu finden seien.

Bei keinem dieser Myome waren Hinweise auf eine Expression zu finden, so daß auch aus diesen Ergebnissen darauf geschlossen werden kann, daß bei der Entstehung dieser Myome HMGIC-Genexpression nicht das primäre Ereignis ist.

Beispiel 4

Für die Untersuchung der Wirkung von HMGIC auf den SV 40-Promotor werden zwei Vektorsysteme in eine Zelle transfektiert. Dies sind der Expressionsvektor H₃H_x für HMGIC und

der „pGL3 Luciferase Reporter Vektor“ der Firma Promega. Das komplette „pGL3 Luciferase Reporter Vektor“-System von Promega umfaßt 4 verschiedene Vektoren, die es ermöglichen, DNA-Abschnitte hinsichtlich Promotor- oder Enhancer-Regionen zu untersuchen. Diese Vektoren sind in Fig. 2 dargestellt. Für die Untersuchung von Promotor-Abschnitten wird der Vektor „pGL3-Enhancer“ benötigt. Der Vektor „pGL3-Promotor“ ist für die Untersuchung von Enhancer-Elementen vorgesehen. Des Weiteren wird der Vektor „pGL3-Promotor“ bei diesem Versuch verwendet, um die Wirkungsweise von HMGIC auf einen SV40-Promotor bzw. Promotoren anderer Polyomaviren zu testen. Hierzu wird der Vektor H_3H_x mit dem Vektor „pGL3-Promotor“ kotransfektiert.

Der Vektor „pGL3-Control“ dient als Positivkontrolle für das System, eine Transfektion ausschließlich mit dem Vektor „pGL3-Promotor“ als Negativkontrolle.

Die einzelnen Vektoren haben abgesehen von Promotor- und Enhancer-Elementen die gleiche Grundstruktur. Sie verfügen über eine modifizierte Kodierungsregion für Feuerfliegen-Luciferase (*Photinus pyralis*) (*luc+*), welche für die Untersuchung der Transkriptionsaktivität in transfektierten eukaryotischen Zellen gewählt wurde. Des Weiteren enthalten sie einen prokaryotischen Replikationsursprung zur Vermehrung in *E.coli*, ein Ampicillin-Resistenzgen für die Selektion, einen Replikationsursprung von filamentösen Phagen (f1 ori) für die Produktion einzelsträngiger DNA (ssDNA) und eine „multi cloning site“ (MCS) 3' und 5' des Luciferase-Gens.

Der „pGL3-Promotor“-Vektor ist 5010 Basenpaare groß und enthält im Gegensatz zum „pGL3-Enhancer“ einen SV40-Promotor und keinen Enhancer. DNA-Fragmente, die vermeintliche Enhancer-Sequenzen enthalten, können 3' oder 5' des Luciferase-Gens eingesetzt werden und so zu einer Verstärkung führen. Des Weiteren kann der SV40-Promotor durch andere Polyomavirus-Promotoren ersetzt werden.

Der Vektor „pGL3-Control“ (5256 Basenpaare) enthält einen SV40 Promotor und eine Enhancer-Sequenz, was in den meisten Säugerzellen zu einer starken Expression von *luc+* führt.

Dieser Vektor dient zur Kontrolle der Transfektionseffizienz und setzt den internen Standard für die Promotor- und Enhancer-Aktivität der anderen Vektoren.

Für die Untersuchung haben sich HeLa-Zellen als geeignet erwiesen, da sie sehr leicht zu handhaben sind, den Vorgang der Transfektion nahezu ohne Schaden überstehen und keine Expression von HMGIC aufweisen (das Nichtvorhandensein der HMGIC Expression wurde durch „Northern Blot“ nachgewiesen). Die Zellen werden für die Transfektion in Platten mit 6 Näpfen herangezogen.

Für den Vorgang der Transfektion wurden 2 μ g DNA mit Zellmedium (TC 199), ohne Kälber-serum und Antibiotika, gemischt (beides kann die Komplexbildung stören), Endvolumen 100 μ l.

Zu dem DNA-Gemisch werden 10 μ l „SuperFect“ zugegeben. Nach dem Mischen inkubiert man 10 min bei Raumtemperatur, wobei sich Komplexe aus der DNA und dem „SuperFect“ bilden.

Während der Inkubation wird von den Zellen das alte Medium abgesaugt und die Zellen mit 1x PBS gespült. Das Gemisch aus „SuperFect“ und DNA wird mit 800 μ l Zellmedium mit 20% Kälberserum gemischt, welches anschließend auf die Zellen gegeben wird. Nach einer Inkubation (im Brutschrank bei 37°C und 6% CO₂) von 16-18 Stunden wird frisches Medium (20%) zugegeben und weitere 8-32 Stunden inkubiert.

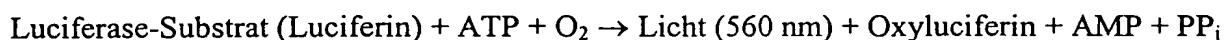
Die Auswertung des Versuches erfolgt mit dem „Luciferase Assay Kit“ von Stratagene (s.u.).

Luciferase-Extraktion und Bestimmung der Luciferase-Konzentration:

Nach der Inkubation der transfektierten Zellen wird das Medium abgesaugt und 500 μ l 1x Zellysepuffer zugegeben. Nach 15-minütiger Inkubation, bei Raumtemperatur auf einem

Schüttler, lysieren die Zellen. Das Zellysat wird in Eppendorf-Cups überführt. Dieses ist für kurze Zeit bei 4°C lagerbar. Über längere Zeit kann es bei -80°C gelagert werden, hierbei geht jedoch bis zu 50% der Luciferase-Aktivität verloren.

Für die Bestimmung der Luciferasekonzentration werden 20µl Zellysat mit 100µl „Luciferase assay reagent“ (LSA) (beides sollte Raumtemperatur haben) gemischt. Das Luciferin im Reaktionsgemisch wird unter ATP Verbrauch umgesetzt, wobei Lichtquanten entstehen.



Die emittierten Lichtquanten können mit einer Photozelle eines Luminometers gemessen werden. Die ermittelten Werte werden in relativen Lichteinheiten (relative light units (RLU)) angegeben und vermitteln im Verhältnis zu anderen Werten Auskunft über die gebildete Menge an Luciferase.

Ergebnisse:

Bisher wurden zwei voneinander getrennte Meßreihen durchgeführt. Weitere Messungen, vor allen Dingen mit Promotorregionen der BK- und JCV-Viren können leicht vorgenommen werden, im vorliegenden Testsystem durch Klonierung der entsprechenden Promotorregionen in die Testvektoren.

Die Ergebnisse der ersten 2 Meßreihen sind in Tabelle 4 zusammengefaßt.

Tabelle 4: Ergebnisse der Transfektionsversuche

	Positiv-kontrolle	Negativ-kontrolle	1µg H ₃ H _x (1µg pGL3-P)	0,5.µg H ₃ H _x (1µg pGL3-P)	0,25µg H ₃ H _x (1µg pGL3-P)
relative Licht-einheiten 1. Versuch	14.500	1.800	4.300	8.800	3.800
relative Lichteinheiten 2. Versuch	15.100	2.100	5.100	9.400	4.800

Die Meßergebnisse liegen über denen der Negativkontrolle und unter denen der Positivkontrolle mit sehr starkem Promotor, was deutlich eine leichte Regulierung der virale Promotorregion durch HMGIC belegt.

Dies belegt die vorstehend beschriebene Beteiligung von Viren an der Entstehung von Leiomyomen, Endometriumpolypen und Endometriose.

Die in der vorstehenden Beschreibung sowie in den Ansprüchen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebiger Kombination für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein. Der Offenbarungsgehalt der Ansprüche wird hiermit durch Bezugnahme aufgenommen.

Beispiel 5

In diesem Beispiel werden die Ergebnisse eines PCR-Tests dargestellt, der durchgeführt wurde, um nach Adenovirus-spezifischen DNA-Sequenzen in Myomgeweben zu suchen. Dabei stehen für alle 6 Subgenera der Adenoviren spezifische Oligonukleotide zur Amplifikation von viralen DNA-Sequenzen zur Verfügung.

Unter Anwendung des PureGene Kits (Fa. Gentra, deutscher Vertrieb Biozym) wurde DNA aus 16 Myomen, 6 Zellkulturen von Myomen, 1 Myometrium und 2 Blutproben isoliert.

DNA von 8 Myomen, allen 6 Zellkulturen, des Myometriums und der Blutproben wurden in eine PCR eingesetzt. Verwendet wurden die Oligonukleotidpaare HsgA1 (SEQ: ID. No 1: aagggtgtcaatyatgtttg) /HsgA2 (SEQ ID.NO. 2: acggttacttkttt) und HsgB1 (SEQ ID No. 3: tctattccctacctggat) /HsgB2 (SEQ ID. No. 4: actcttaacggcagtag) aus der Sequenz des Hexon-Gens, die jeweils Adenovirus-DNA der Gruppe A bzw. B amplifizieren (Pring-Akerblom et al., J. Med. Virol. 58, 87-92, 99). Das Oligonucleotidpaar HsgA amplifiziert ein Fragment von 299 bp, das Oligonucleotidpaar HsgB ein Fragment von 465 bp. Als Positivkontrollen wurden Virus-DNA Proben der Adenovirus Subgenera A (Ad18) und B (Ad7) verwendet, die von Frau Dr. Patricia Pring-Akerblom, Medizinische Hochschule Hannover, Institut für Virologie und Seuchenhygiene, 30623 Hannover zur Verfügung gestellt wurden. Folgender PCR-Ansatz wurde verwendet:

500 ng DNA (Myome/Blut) bzw. 50 ng Virus-DNA

1.5 mM MgCl₂

je 0.5 μM Primer

5 μl 10×PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Sigma)

200 μM dNTP

2.5 U Taq-Polymerase (Sigma)

Jeder Ansatz enthielt 50 μl Gesamtvolumen. Folgende Zyklen wurden durchgeführt:

1x 6 min 95°C
40x 40 sec 92°C
30 sec 41°C
40 sec 72 °C
1x 5 min 72°C

Der gesamte Ansatz wurde in einem 1-%igen Agarosegel aufgetragen.

Fig. 6 zeigt das Ergebnis der PCR-Analyse zur Prüfung auf mögliche DNA-Sequenzen von Adenoviren mit Konsensus-Primern der Gruppe B. Mit Ausnahme der Virus-Kontroll-DNA konnte mit Primerpaar HsgA keine Amplifikation des 299 bp-Fragmentes nachgewiesen werden. Mit Primerpaar HsgB wurde bei vier DNA-Fragmenten von Uterus-Leiomyomen (My178.1; My174.3; My174.4; My161.7) (Zellkultur und primäres Tumorgewebe) und der viralen Kontroll-DNA (humaines Adenovirus 7) eine Amplifikation des 465 bp-Fragmentes nachgewiesen. Weder aus Blut-DNA noch aus DNA aus normalem Myometrium aus einem Uterus myomatosus (My187.6) oder den untersuchten Lungen-Hamartomen (H) wurde ein entsprechendes Produkt amplifiziert. M5 bezeichnet einen Marker (DNA-Standard V, Roche, Penzberg), Pfeil: Lage des spezifischen 465bp-Fragmentes. Damit konnte eindeutig der Nachweis viraler DNA-Sequenzen des Adenovirus-Typ B in den Myomgeweben erbracht werden.

Beispiel 6

Zur näheren Charakterisierung der PCR-Produkte wurden diese in einen geeigneten Vektor kloniert und aus dem Vektor von beiden Seiten sequenziert. Hierzu wurde ausgehend von den Ergebnissen der PCR-Analysen (siehe Beispiel 5) die dem 465 bp-Amplifikat entsprechende DNA (6 Fragmente aus 6 Myom-DNA-Proben und 1 Fragment aus der Virus-Kontroll-DNA Ad7) mit Hilfe des QIAEX II-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben (QIAEX II Handbook Ausgabe August 1996, S. 12-13) aus dem Agarose-Gel eluiert. Ferner

wurde ein größerers Fragment, das aus der DNA My174.3 amplifiziert wurde (Vergl. Bsp. 5), eluiert. Im folgenden Schritt wurde die gereinigte DNA in den Vektor pGEM-T Easy (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben (Technical Manual pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems, S. 11) ligiert und das Vektorkonstrukt in *E.coli* kloniert (Technical Manual pGEM-T and pGEM-T Easy Vector Systems, S. 12-13). Plasmid-DNA positiver Bakterienklone wurde mit Hilfe des QIAprep-Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland) nach Herstellerangaben (QIAprep Miniprep Handbook Ausgabe April 1998, S. 18-19) isoliert. Die Sequenzierung der klonierten Inserts erfolgte unter Verwendung der Oligonukleotide M 13 universal und M 13 revers und mit Hilfe einer automatischen Sequenziereinheit (373 Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland). Die vergleichende Analyse der Sequenzen erfolgte mit Hilfe der vom amerikanischen National Center for Biotechnology (NCBI) Information des National Institute of Health per Internet veröffentlichten Datenbanken (Zugang: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und Suchmethoden (Advanced BLAST, Datenbank „nr“ ohne Angabe einer bestimmten Spezies).

Ergebnisse: Die amplifizierten Sequenzen aus allen Tumoren und Tumorzellkulturen entsprechen (mit einigen Abweichungen, siehe Abb. 3, Abb. 4 und Tabelle 5) dem 465 bp langen PCR-Fragment der Positivkontrolle. Die Sequenz, die bei der Analyse des größeren Fragment des Amplifikats aus My174.4 erhalten wurde, ergab in der vergleichenden Analyse keinen Match zu einer viralen Sequenz.

Tabelle 5

PCR – Produkt	Bester Match Zugangsnummer	Anzahl der Mutationen	Besonderheiten
M 3-3 (Kontrolle AD7)	AF065065	2	4xN, 2 Austauschmutationen
M 2-3 (Myom-DNA)	X765551	0	
M 5-1 (Myom-DNA)	AF 065065	0	
M 6-1 (Myom-DNA)	AF 065068	1	Keine Austauschmutation

M 7-1 (Myom-DNA)	X765551	8	Keine Austauschmutation
M 8-2 (Myom-DNA)	X765551	10	1 Austauschmutation
M 9-2 (Myom-DNA)	AF065065	8	Keine Austauschmutation

Damit wurde gezeigt, daß die viralen Sequenzen, die aus den einzelnen Myomen amplifiziert wurden, der Sequenz des Adenovirus Typ 7 am ähnlichsten sind und untereinander an Hand von Punktmutationen unterschieden werden können.

Erläuterungen zu Fig. 3a – c, Fig. 4a-b und Tabelle 5

Die vergleichende Analyse der DNA- und Proteinsequenzen ergab den Nachweis, einer hohen Homologie der aus den Myomengeweben amplifizierten Sequenzen zu veröffentlichten Sequenzen aus der Hexonregion des Adenovirus Typ 7. Die einzelnen DNA-Sequenzen weisen Punktmutationen auf und unterscheiden sich untereinander. Mit Ausnahme einer Punktmutation, die zu einem Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz von M 8-2 führt, erweisen sich alle übrigen Mutationen als sogenannte stille Mutationen. Die Sequenzunterschiede sind jeweils in den Abbildungen Fig. 3a – c durch Kästchen markiert. Verwendete Nomenklatur: X765551, AF 065068, AF 65065: veröffentlichte Sequenzen adenoviraler Hexongene, M 3-3P: Positivkontrolle (siehe Beispiel 5), M 2-3, M 5-1, M 6-1, M7-1, M 8-2, M 9-2: verschiedene Sequenzen von Amplifikaten aus Myomgewebe.

Die Abbildung Fig. 4a – b zeigt eine vergleichende Analyse aller aus den verschiedenen Myomgeweben erhaltenen DNA-Sequenzen. Die Unterscheidungen sind durch Kästchen markiert. Die verwendete Nomenklatur entspricht derjenigen von Fig. 3 a-c.

Beispiel 7

HMGI(Y)-Proteine können durch die Bindung an virale Promotoren die Expression von viralen Proteinen beeinflussen. Anhand der veröffentlichten Sequenz des Promotors des Gens E1a

(Zugangsnummer X03000 oder NCBI-Datenbank; E1a ist ein adenovirales Gen, dessen Genprodukt eine transformierende Funktion zugeordnet wird) und mittels veröffentlichter Daten zur Bindungsmodalität von HMGI(Y) an DNA-Sequenzen (vgl. Yie et al., Molecular and Cellular Biology 17: 3649 – 3662, 1997) wurde überprüft, ob HMGI(Y) an die Promotersequenz binden kann. Proteine der HMGI-Y Gruppe enthalten drei Bindungsdomänen, von denen jeweils 2 parallel an DNA-Sequenzen, die aus einer Reihung von mindestens 4 Adeninen und Thymidinen bestehen, binden können. Diese DNA-Sequenzen liegen idealerweise 10 oder 20 Basenpaare von einander entfernt, da die bindenden HMGI-Y Proteine auf Grund der Lage der Bindungsdomänen 1-2 helikale Windungen der DNA umspannen können (Yie et al., Molecular and Cellular Biology, 17: 3649-3662, 1997). Binden HMGI-Y Proteine auf die beschriebene Weise an zelluläre oder virale Promotoren, so wird die Promoter-vermittelte Wirkung im Sinne einer Aktivierung oder Hemmung modifiziert. Mittels Sequenzvergleich unter Verwendung der über NCBI veröffentlichten Datenbanken (siehe Beispiel 6) wurde die Promotersequenz des adenoviralen Proteins E1A identifiziert (Zugangsnummer X03000, Nukleotide 1-511, Quelle: AD7). An Hand der beschriebenen Kriterien wurden zahlreiche Bindungsstellen für HMGIY Proteine ermittelt (Vergl. Fig. 5). Exemplarisch sind zwei dieser identifizierten Bindungsstellen, die parallel durch zwei Bindungsdomänen eines HMGI-Y Proteins gebunden werden können, durch eine Klammer verbunden worden.

Hiermit wurde gezeigt, daß HMGI-Y Proteine an die Promotersequenz binden können.

Beispiel 8

Es wurden anhand der über NCBI publizierten Sequenz des linken Endes von AD7 (Zugangsnummer X 03000) die Oligonucleotide ADE1Bgl2S: (SEQ ID. NO. 5): gaa gat ctt tat aga tgg aat ggt gcc aac at und ADE1Hi3AS (SEQ. ID. NO. 6): ccc aag ctt aaa act ctt ctc gct ggc agt c ausgewählt, die an die Promotersequenz des E1A-Gens des Adenovirus 7 binden können. Das Oligonucleotid ADE1Bgl2S enthält eine Bgl II-Schnittstelle und das Oligonucleotid ADE-Hi3AS enthält eine HindIII-Schnittstelle. Beide Schnittstellen sind in der oben angegebenen

Sequenz unterstrichen. Unter der Verwendung der Oligonukleotide wurde ein 521bp langes Fragment aus der AD7-Promoter-Region amplifiziert und über die Schnittstellen BgII und HindIII mittels Standardmethoden (Maniatis) in den Luciferase-Reportervektor pGL3-Enhancer (Promega) kloniert (pAD7PROM). Als Template (Matrize) wurde die AD7-DNA, die bereits im Beispiel 5 als Positivkontrolle gedient hat, verwendet. Das amplifizierte Fragment fungiert dann als Promoter für das im Vektor vorhandene Firefly-Luciferase-Gen, dessen Aktivität durch ein Luciferase-Assay (Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System, Promega) messbar ist. Die Co-Transfektion des o.g. Konstruktes mit einem HMGIC-Expressionsvektor (H3HX) sowohl in Hela-Zellen als auch in primäre Myometrium-Zellen aus der 1. Passage der Gewebekultur erbrachte den Nachweis einer Modifizierung der E1A-Promotorfunktion durch HMGIC. Alle Transfektionen wurden mit dem Superfect nach dem Protokoll der Firma Qiagen durchgeführt. In Abänderung zum Original-Protokoll wurde jeweils 1 µg der jeweiligen Konstrukte verwendet und die Zellen wurden nicht mit PBS gewaschen. Die Inkubation wurde von wenigen Stunden auf eine Über-Nacht-Inkubation verlängert und nach dieser wurde das Superfect nicht abgenommen, sondern 3 mL Medium zu den Kulturen gegeben. Damit wurde gezeigt, daß die Expression des transformierenden adenoviralen Proteins E1A durch die Bindung von HMGIC-Proteinen in der viralen Promoter-Region beeinflußt wird. Als Negativ-Kontrollen wurden zwei weitere Co-Transfektionen durchgeführt, wobei einmal der Expressionsvektor keine klonierte *HMGIC*-Sequenz enthielt und zusätzlich wurde transfektiert ohne Zugabe des *HMGIC*-Expressionkonstrukts. Als Positiv-Kontrolle diente der pGL3-Kontroll-Vektor, der einen SV40-Promoter und SV40-Enhancer enthält. Um Ungenauigkeiten bei der Zellkultur auszuschließen, wie z.B. unterschiedliche Anzahl der Zellen pro Zellkulturschale, unterschiedliche Effizienz bei Transfektion und Zell-Lysis, wird die Aktivität des experimentellen Reporterkonstrukts (s.o.) durch Co-Transfektion mit einem internen pRL-Kontroll-Vektor (pRL-TK, Renilla-Luciferase) normalisiert. Die Durchführung der Luciferase-Messungen erfolgte nach dem Protokoll des "Dual-Luciferase-Reporter-Assay-System" von Promega.

Ein weiteres Beispiel für die Induktion von Gewebeveränderungen durch die Infektion der Gewebezellen mit Adenoviren sind die Lungenhamartome. Dieses Beispiel beschreibt die Strategie zur Überprüfung und zum Nachweis von adenoviralen Genomen in verschiedenen Lungenhamartomgeweben.

Unter Anwendung des PureGene Kits (Fa. Gentra, deutscher Vertrieb Biozym) wurde DNA aus 10 Zellkulturen von Hamartomen isoliert.

DNAAs von 7 Zellkulturen wurden in eine PCR eingesetzt. Verwendet wurden die Oligonukleotidpaare HsgA1/HsgA2, HsgB1/HsgB2, HsgC1 [(SEQ. ID. NO. 7): acctttgactcttgt]/HsgC2 [(SEQ. ID. NO. 8): tccttgatatttagtac], HsgD1 [(SEQ. ID. NO. 9): ccatcatgttgcactct]/HsgD2 [(SEQ. ID. NO. 10): aggttagccggtaagacc], HsgE1 [(SEQ. ID. NO. 11): gactctccgtcagctgg]/HsgE2 [(SEQ. ID. NO. 12): gctggtaacggcgctct] und HsgF1 [(SEQ. ID. NO. 13): atttctattccctcgcg]/HsgF2 [(SEQ. ID. NO. 14): tcaggctggtaacggcc], aus der Sequenz des Hexon-Gens, die jeweils Adenovirus-DNA der Gruppen A bis F amplifizieren (Pring-Akerblom et al., J. Med. Virol. 58, 87-92, 99). Oligonukleotidpaar HsgA amplifiziert ein Fragment von 299 bp, Oligonukleotidpaar HsgC von 269 bp, Oligonukleotidpaar HsgD von 331 bp, Oligonukleotidpaar HsgE von 399 bp und Oligonukleotidpaar HsgF von 586 bp. Die als Kontrolle verwendeten Virus-DNA-Proben wurden ebenfalls von Frau Dr. Pring-Akerblom zur Verfügung gestellt (vergl. Beispiel 5: Subgenus A: Ad18, Subgenus B: Ad7, Subgenus C: Ad1, Subgenus D: Ad17, Subgenus E: Ad4, Subgenus F: Ad41)

Folgender PCR-Ansatz wurde verwendet:

500 ng DNA (Gewebe, Zellkultur) bzw. 50 ng Virus-DNA

1.5 mM MgCl₂

je 0.5 μM Primer

5 μl 10×PCR-Puffer ohne MgCl₂ (Sigma)

200 μM dNTP

2.5 U Taq-Polymerase (Sigma)

Jeder Ansatz enthielt 50 µl Gesamtvolumen. Folgende Zyklen wurden durchgeführt:

1× 6 min 95°C
40× 40 sec 92°C
30 sec 41°C
40 sec 72 °C
1× 5 min 72°C

Der gesamte Ansatz wurde in einem 1,5%igen Agarosegel aufgetragen. Mit den Oligonukleotidpaaren HsgA1/HsgA2, HsgB1/HsgB2, HsgC1/HsgC2 und HsgF1/HsgF2 wurde kein Fragment der jeweils erwarteten Länge aus den verschiedenen Lungenhamartom-DNA-Proben amplifiziert werden, wobei das entsprechende Fragment aus der viralen Kontroll-DNA amplifiziert wurde. Aus den DNA-Proben von 3 Lungenhamartomen wurde mit den Oligonucleotiden HsgD1/HsgD2 ein 331 bp Fragment amplifiziert. Aus 4 weiteren Lungenhamartom-DNA-Proben wurde mit dem Oligonucleotidpaar HsgF1/HsgF2 ein 399 bp langes Produkt amplifiziert.

Damit wurde eindeutig gezeigt, daß eine Infektion der Ursprungszelle mit Adenoviren der Gruppe D oder E zur Bildung von Lungenhamartomen führt.

Beispiel 10

Um zu prüfen, ob Zellen von Lungenhamartomen in vitro permissiv sein können, wurden Hela-Zellen mit Zellen eines Lungenhamartoms kokultiviert. Hela-Zellen werden häufig für die Vermehrung von Adenoviren benutzt und zeigen nach Infektion cytopathologische Effekte.

Das verwendete Hamartomgewebe stammte von einem Tumor mit einer chromosomalen Translokation t(6;14)(p21;q24). Er wurde nach der Operation für 26 Stunden in Hank's Lösung bei Raumtemperatur gelagert und dann mit Schere und Skalpell in ca. 1 mm³ große Würfel zerkleinert. Nach Routinemethoden erfolgte dann enzymatisch die weitere Zerkleinerung mit Kollagenase (Kazmierczak et al., Oncogene, 12: 515 – 521). Die resultierende Zellsuspension wurde auf vier 25 cm² Zellkulturflaschen verteilt, die jeweils mit 5 ml Zellkulturmedium (Medium 199 mit 20 % fetalem Kälberserum unter Zusatz von Antibiotika) vorgefüllt waren. Nach dreitägiger Kultivierungsdauer bei 3°C, 5 % CO₂ hatte sich in den Flaschen ein konfluenter Monolayer gebildet. Die Zellen wurden daraufhin nach Standardverfahren mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und jeweils auf zwei neue Kulturflaschen verteilt. Nach zwei Stunden wurden zu den Kulturflaschen jeweils ca. 3x10⁵ Hela-Zellen in 1 ml Kulturmedium gegeben. Nach eintägiger Kultivierung enthielten die Flaschen je etwa 50 % von Hela-Zellen und fibroblastenartigen Hamartom-Zellen. Die Serumkonzentration im Medium wurde auf 10 % reduziert. Nach zwei weiteren Tagen zeigten die Hela-Zellen an mehreren Stellen Veränderungen der Zellmorphologie und begannen sich elipsenartige Zellen vom Boden der Kulturgefäße abzulösen. Nach vier Tagen waren nur noch einzelne Gruppen von Hela-Zellen nachzuweisen, die allerdings proliferierten.

Der aufgetretene cytopathologische Effekt kann auf für Adenoviren permissive Hamartomzellen zurückgeführt werden, die Hela-Zellen infiziert haben.

Die in der vorstehenden Beschreibung, den Ansprüchen sowie den Zeichnungen offenbarten Merkmale der Erfindung können sowohl einzeln als auch in beliebigen Kombinationen für die Verwirklichung der Erfindung in ihren verschiedenen Ausführungsformen wesentlich sein.

BOEHMERT & BOEHMERT

ANWALTSSOZIETÄT

58

Boehmert & Boehmert • P.O.B. 43 02 54 • D-80732 München

Deutsches Patent- und Markenamt
Zweibrückenstr. 12
80297 München

DR.-ING. KARL BOEHMERT, PA (1898-1973)
DIPL.-ING. ALBERT BOEHMERT, PA (1902-1993)
WILHELM J. H. STAHLBERG, RA, Bremen
DR.-ING. WALTER HOORMANN, PA*, Bremen
DIPL.-PHYS. DR. HEINZ GODDAR, PA*, München
DR.-ING. ROLAND LIESEGANG, PA*, München
WOLF-DIETER KUNTZE, RA, Bremen, Alicante
DIPL.-PHYS. ROBERT MÜNZHUBER, PA (1933-1992)
DR. LUDWIG KOKER, RA, Bremen
DR. (CHEM.) ANDREAS WINKLER, PA*, Bremen
MICHAELA HUTH-DIERIG, RA, München
DIPL.-PHYS. DR. MARION TÖNHARDT, PA*, Düsseldorf
DR. ANDREAS EBERT-WEIDENFELLER, RA, Bremen
DIPL.-ING. EVA LIESEGANG, PA*, München

PROF. DR. WILHELM NORDEMANN, RA, Brandenburg
DR. AXEL NORDEMANN, RA, Berlin
DR. JAN BERND NORDEMANN, LLM, RA, Berlin
DIPL.-PHYS. EDUARD BAUMANN, PA*, Höhenkirchen
DR.-ING. GERALD KLOPSCH, PA*, Düsseldorf
DIPL.-ING. HANS W. GROENING, PA*, München
DIPL.-ING. SIEGFRIED SCHIRMER, PA*, Bielefeld
DIPL.-PHYS. LORENZ HANEWINCKEL, PA*, Paderborn
DIPL.-ING. DR. JAN TÖNNIES, PA, RA, Kiel
DIPL.-PHYS. CHRISTIAN BIEHL, PA*, Kiel
DIPL.-PHYS. DR. DOROTHÉE WEBER-BRULS, PA*, Frankfurt
DR.-ING. MATTHIAS PHILIPP, PA*, Bremen
DIPL.-PHYS. DR. STEFAN SCHOHE, PA*, München
MARTIN WIRTZ, RA, Düsseldorf
DR. DETMAR SCHÄFER, RA, Bremen
DIPL.-CHEM. DR. ROLAND WEIB, PA, Düsseldorf
DIPL.-PHYS. DR.-ING. UWE MANASSE, PA, Bremen
DR. CHRISTIAN CZYCHOWSKI, RA, Berlin
DR. CARL-RICHARD HAARMANN, RA, München
DIPL.-BIOL. DR. ARMIN K. BOHMANN, PA, München
DIPL.-PHYS. DR. THOMAS L. BITTNER, PA, Berlin
DR. VOLKER SCHMITZ, RA, München
DR. FRIEDRICH NICOLAUS HEISE, RA, Paderborn

PA - Patentanwalt/Patent Attorney
RA - Rechtsanwalt/Attorney at Law
* - European Patent Attorney
Alle zugelassen zur Vertretung vor dem Europäischen Markenamt, Alicante
Professional Representation at the Community Trademark Office, Alicante

In Zusammenarbeit mit/in cooperation with
DIPL.-CHEM. DR. HANS ULRICH MAY, PA*, München

Ihr Zeichen
Your ref.

Ihr Schreiben
Your letter of

Unser Zeichen
Our ref.

München,

Neuanmeldung
(Patent)

BM3960

13. September 1999

Prof. Dr. Jörn Bullerdiek, Weißdornpfad 14, 28355 Bremen

Mittel zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen mesenchymalen Ursprungs

1. Mittel zur Prävention und/oder Behandlung einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt und das Mittel ein anti-viral wirksames Agens umfaßt, das gegen ein Virus wirksam ist, dessen Nukleinsäure mindestens eine Bindungsstelle für ein Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate umfaßt.

2. Mittel zur Prävention und/oder Behandlung einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung Gewebe mesenchymalen Ursprungs umfaßt und das Mittel ein anti-viral wirksames Agens umfaßt, das gegen ein Virus wirksam ist, dessen Nukleinsäure für ein Genprodukt

dukt codiert, wobei dieses Genprodukt mindestens mit einem Genprodukt von Genen der HMGI(Y)-Familie oder deren Derivate wechselwirkt.

3. Mittel nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsstelle auf der Nukleinsäure des Virus das Struktur- und Sequenzmerkmal einer ersten AT-reichen Sequenz umfaßt.

4. Mittel nach Anspruch 3, dadurch gekennzeichnet, daß die Bindungsstelle auf der Nukleinsäure des Virus neben der ersten Sequenz noch die Struktur- und Sequenzmerkmale umfaßt, daß

- eine zweite AT-reiche Sequenz vorhanden ist, und

- die erste und zweite Sequenz in einer räumlichen Distanz zueinander angeordnet sind.

5. Mittel nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß die räumliche Distanz so ausgewählt ist, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der Nukleinsäure angeordnet sind.

6. Mittel nach einem der Ansprüche 1-5, dadurch gekennzeichnet, daß die Gene der HMGI(Y)-Familie MAG-Gene, HMGIC, HMGIY, aberrante Transkripte von Genen der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfassen.

7. Mittel nach einem der Ansprüche 1-6, dadurch gekennzeichnet, daß das Gewebe mesenchymalen Ursprungs zumindest teilweise mit einem Virus infiziert ist.

8. Mittel nach einem der Ansprüche 1-7, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeveränderung als ausschließlichen oder obligaten Bestandteil Gewebe umfaßt, wobei wenigstens einige

der das Gewebe aufbauenden Zellen mit einem Virus nach einem der vorangehenden Ansprüche infiziert sind.

9. Mittel nach einem der Ansprüche 1-8, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeproliferation eine Proliferation mindestens einer mesenchymalen Zelle, die mit einem Virus nach einem der vorangehenden Ansprüche infiziert ist, umfaßt.

10. Mittel nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß die Proliferation eine klonale Proliferation ist.

11. Mittel nach einem der Ansprüche 1-10, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeproliferation eine epitheliale Komponente umfaßt.

12. Mittel nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß die epitheliale Komponente mindestens eine Zelle aufweist, die mit einem Virus nach einem der vorangehenden Ansprüche infiziert ist.

13. Mittel nach einem der Ansprüche 1-12, dadurch gekennzeichnet, daß die mit einem Virus nach einem der vorangehenden Ansprüche infizierte Zelle ein chromosomal Veränderung aufweist.

14. Mittel nach Anspruch 13, dadurch gekennzeichnet, daß die chromosomale Veränderung mindestens ein HMGI(Y)-Gen der infizierten Zelle umfaßt.

15. Mittel nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, daß das HMGI(Y)-Gen aus der Gruppe ausgewählt ist, die MAG-Gene, HMGIC, HMGIY, aberrante Transkripte von Genen der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfaßt.

16. Mittel nach einem der Ansprüche 1-15, dadurch gekennzeichnet, daß die Gewebeveränderung ausgewählt ist aus der Gruppe, die Leiomyome, insbesondere Leiomyome des Uterus; Endometriumpolypen; Endometriose; Fibroadenome, insbesondere Fibroadenome der Mamma; Phyllodes-Tumoren, insbesondere der Mamma; Hamartome, insbesondere der Mamma; Prostata-Adenome; Lipome; aggressive Angiomyxome; Enchondrome; pleomorphe Adenomem, insbesondere der Kopfspeicheldrüsen; Kolon-Polypen, insbesondere Kolon-Adenome; Hamartome, insbesondere der Lunge; Atherome und daraus entstandene Karzinome umfaßt.

17. Mittel nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß die entstandenen Karzinome aus der Gruppe ausgewählt sind; die Kolon-Karzinome und Prostata-Karzinome umfaßt.

18. Mittel nach einem der Ansprüche 1-17, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus ausgewählt ist aus der Gruppe, die DNA-Viren, und insbesondere Adenoviren und Herpesviren, umfaßt.

19. Mittel nach einem der Ansprüche 1 bis 18, dadurch gekennzeichnet, daß das Agens ausgewählt ist aus der Gruppe, die Impfstoffe; Antikörper; Mittel, die die Replikation, Transkription oder Translation viraler, insbesondere adenoviraler Gene hemmen; Mittel, die mit Viren, insbesondere Adenoviren, infizierte Zellen erkennen und/oder zerstören; und Mittel, die durch ihre Effektorzellen-stimulierende Wirkung eine antivirale Wirkung erzielen, umfaßt.

20. Mittel nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Impfstoff einen Antikörper umfaßt, der gegen das Virus oder einen Teil davon gerichtet ist.

21. Mittel nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Impfstoff ein Viruspartikel oder einen Teil davon nach einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt.

22. Mittel nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ausgewählt ist aus der Gruppe, die monoklonale Antikörper, polyklonale Antikörper, polyvalente Antikörper, Antikörperfragmente und Derivate davon umfaßt.

23. Verwendung des Mittels nach einem der Ansprüche 19 bis 22 zur Immunisierung gegen Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie der Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche verbunden sind.

24. Verwendung des Mittels nach einem der Ansprüche 1-23 zur Herstellung einer pharmazeutischen Zusammensetzung umfassend das Mittel nach einem der vorangehenden Ansprüche und einen pharmazeutisch akzeptablen Träger zur Prävention und/oder Behandlung der Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche oder zur Immunisierung gegen die Viren, die mit der Pathogenese und/oder Ätiologie der Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche verbunden sind.

25. Verwendung nach Anspruch 23 oder 24, dadurch gekennzeichnet, daß die Immunisierung eine aktive Immunisierung ist.

26. Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche geeigneter Viren und/oder zum Ermitteln von Viren, gegen die das Mittel nach einem der vorangehenden Ansprüche gerichtet ist, welches die Schritte umfaßt:

a) Transfektion einer Zellkultur mit normalem Karyotyp, die abgeleitet ist von einem Gewebe, das die Gewebeveränderung nach einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt, mit einem Expressionsvektor für ein Gen der HMGI(Y)-Familie oder dessen Derivat,

- b) Vergleich des RNA-Musters der transfizierten Zellen mit demjenigen von Kontrollkulturen, und
- c) Überprüfen von in den transfizierten Kulturen gegenüber Kontrollkulturen exprimierten oder verstärkt exprimierten RNA(s) durch Sequenzhomologie auf das Vorhandensein viraler Elemente.

27. Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche geeigneter Viren und/oder zum Ermitteln von Viren, gegen die das Mittel nach einem der vorangehende Ansprüche gerichtet ist, welches die Durchführung eines PCR-Tests umfaßt, wobei die für die PCR verwendeten Primer(paare) der Sequenz viraler Nukleinsäure entsprechen.

28. Verfahren zum Ermitteln von zur Herstellung eines Mittels zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche geeigneter Viren und/oder zum Ermitteln von Viren, gegen die das Mittel nach einem der vorangehende Ansprüche gerichtet ist, welches die Schritte umfaßt:

- a) Anlegen einer cDNA-Bibliothek von einem Gewebe, das die Gewebeveränderung nach einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt, das eine Aktivierung eines Gens der HGMI(Y)-Familie oder eines Derivates aufweist, und
- b) Screenen der cDNA-Bibliothek mit einer virusspezifischen Sonde oder
- c) Analyse der cDNA-Klone auf virale Sequenzen oder
- d) Vergleich mit einer cDNA-Bibliothek aus normalem Myometrium.

29. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 28, dadurch gekennzeichnet, daß das Gen der HMGI(Y)-Familie ausgewählt ist aus der Gruppe, die HMGIC, HMGIY, MAG, aberrante Transkripte der Gene der HMGI(Y)-Familie und Derivate davon umfaßt.

30. Verfahren nach einem der Ansprüche 26 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß das Virus, das virale Element oder die virusspezifische Sonde aus der Gruppe von Viren ausgewählt ist, die die Viren nach einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt.

31. Verwendung eines Verfahrens nach einem der Ansprüche 26 bis 30 zum Ermitteln von Viren, gegen die zur Prävention und/oder Behandlung von Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche immunisiert werden kann.

32. Vorrichtung zur Bestimmung eines an der Pathogenese von Gewebeveränderungen nach einem der vorangehenden Ansprüche beteiligten Virus, welche ein Genprodukt von Genen der HGMI(Y)-Familie oder einen Teil davon oder dessen Derivate umfaßt, das/der an einen Träger gebunden ist.

33. Vorrichtung nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die virale Nukleinsäure neben der ersten Sequenz noch die Struktur- und Sequenzmerkmale umfaßt, daß

- eine zweite AT-reiche Sequenz vorhanden ist und

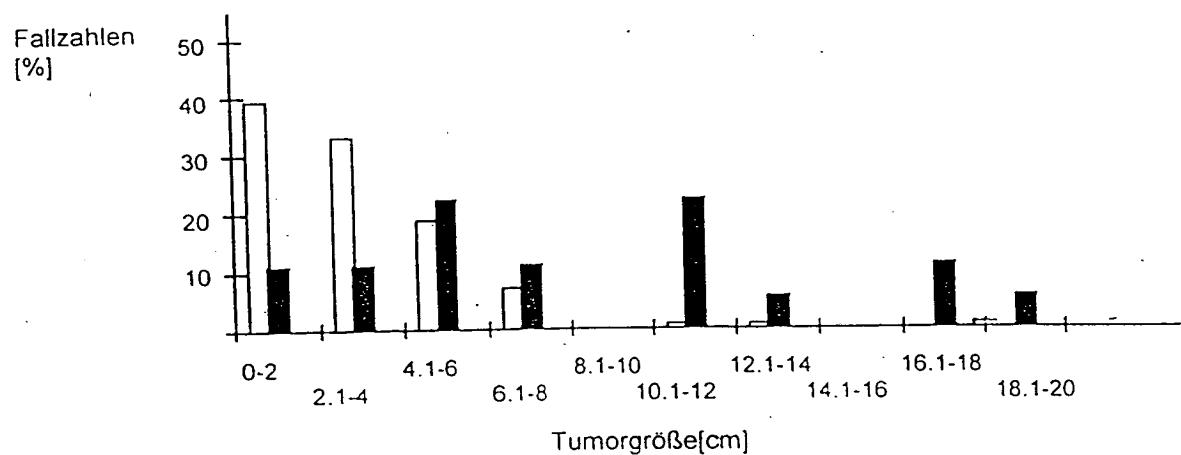
- die erste Sequenz und zweite Sequenz in einer räumlichen Distanz zueinander angeordnet sind.

34. Vorrichtung nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß die räumliche Distanz so ausgewählt ist, daß die erste Sequenz und die zweite Sequenz relativ zueinander in einer Ebene auf der Nukleinsäure angeordnet sind.

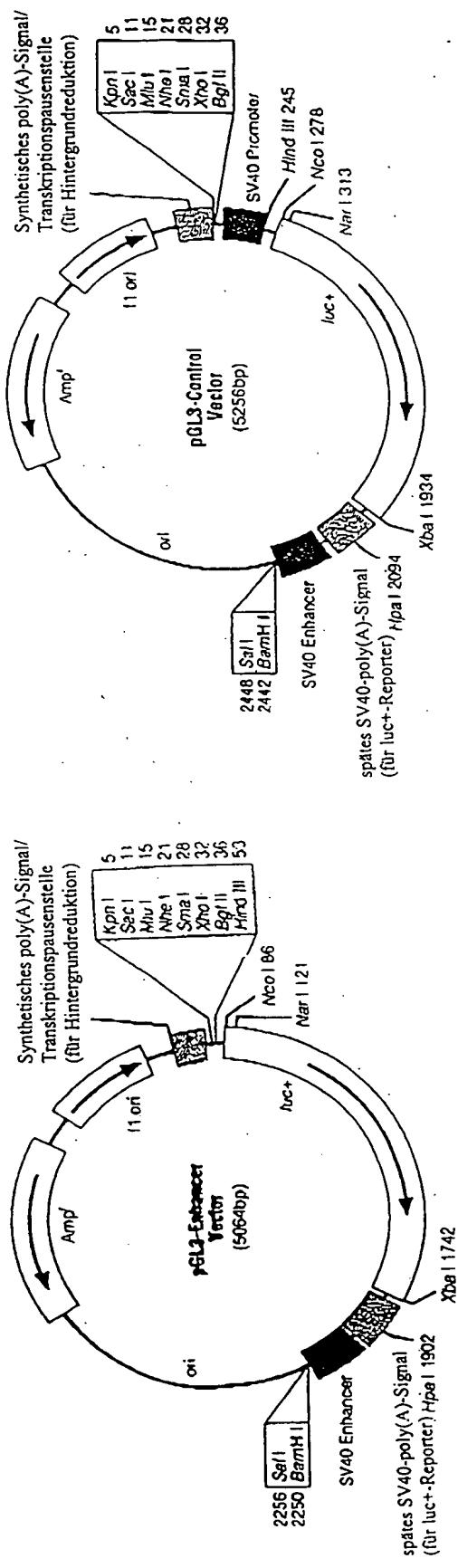
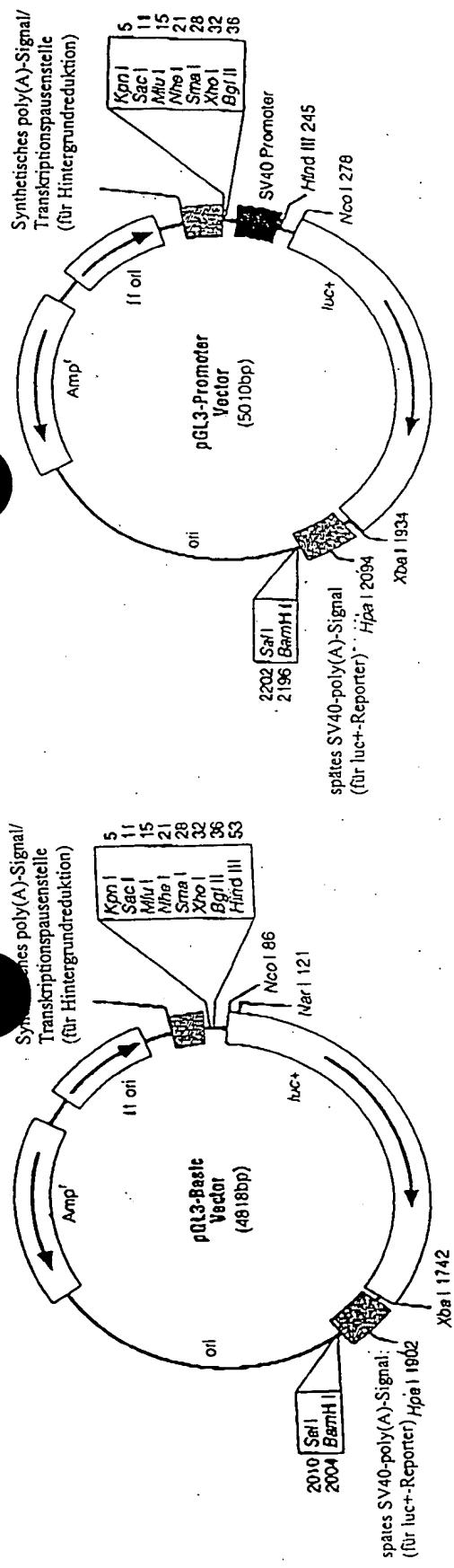
35. Verfahren zur Diagnose einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung eine solche Gewebeveränderung nach einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß eine Körperflüssigkeit auf das Vorhandensein von Antikörpern gegen Viren, wie beschrieben in einem der vorangehenden Ansprüche, besonders DNA-Viren und ganz besonders Adenoviren und/oder Herpesviren untersucht wird.

36. Verfahren zur Diagnose einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung eine solche Gewebeveränderung nach einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß eine Körperflüssigkeit auf das Vorhandensein von Antigenen von Viren, wie beschrieben in einem der vorangehenden Ansprüche, besonders DNA-Viren und ganz besonders Antigene von Adenoviren und Herpesviren untersucht wird.

37. Verfahren zur Diagnose einer Gewebeveränderung, wobei die Gewebeveränderung eine solche Gewebeveränderung nach einem der vorangehenden Ansprüche umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß eine Gewebeprobe mit einem Mittel umgesetzt wird, das aus der Gruppe ausgewählt ist, die Antikörper, die mit Viren, wie beschrieben in einem der vorangehenden Ansprüche, besonders DNA-Viren und ganz besonders Adenoviren und/oder Herpesviren oder Teilen davon reagieren; Antigene, die von Viren, wie beschrieben in einem der vorangehenden Ansprüche, besonders DNA-Viren und ganz besonders Adenoviren und/oder Herpesviren oder Teilen davon stammen, und Nukleinsäure, die mit Nukleinsäure von Viren, wie beschrieben in einem der vorangehenden Ansprüche, besonders DNA-Viren und ganz besonders Adenoviren und/oder Herpesviren wechselwirkt, umfaßt, im Falle der Anwesenheit von Viren, wie beschrieben in einem der vorangehenden Ansprüche, besonders DNA-Viren und ganz besonders Adenoviren und/oder Herpesviren sich ein Komplex aus dem Mittel und dem Virus bildet und der Komplex nachgewiesen wird.



F I G. 1



000-99

68

1 GGCACCTTTAACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCCTCCA X765551Ko.seq
 1 GGCACCTTTAACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCCTCCA M2-3s.seq
 1 GGCACCTT[C]AACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCCTCCA M7-1s.seq
 1 GGCACCTT[C]AACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCCTCCA M8-2s.seq
 1 GGCACCTT[C]AACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCCTCCA X765551Ko.seq
 41 TCATGTTTGACTCCTCAGTCAGCTGGCTTGGAATGACAG X765551Ko.seq
 41 TCATGTTTGACTCCTCAGTCAGCTGGCTTGGAATGACAG M2-3s.seq
 41 TCATGTTTGACTCCTCAGTCAGCTGGCTTGGAATGACAG M7-1s.seq
 41 TCATGTTTGACTCCTCAGTCAGCTGGCTTGGAATGACAG M8-2s.seq
 81 GCTGTTGAGGCCAAATGAGTTGAAATCAGCAGCAGCTGTG M2-3s.seq
 81 GCTGTTGAGGCCAAATGAGTTGAAATCAGCAGCAGCTGTG M7-1s.seq
 81 GCTGTTGAGGCCAAATGAGTTGAAATCAGCAGCAGCTGTG M8-2s.seq
 81 GCTGTTGAGGCCAAATGAGTTGAAATCAGCAGCAGCTGTG X765551Ko.seq
 121 GACGGGGAAAGGGTACAAATGTTGCCCCAATGTAACATGACCA X765551Ko.seq
 121 GACGGGGAAAGGGTACAAATGTTGCCCCAATGTAACATGACCA M2-3s.seq
 121 GACGGGGAAAGG[A]TACAA[C]GTTG[C]AAATG[C]ACATGACCA M7-1s.seq
 121 GACGGGGAAAGG[A]TACAA[C]GTTG[C]AAATG[C]ACATGACCA M8-2s.seq
 161 AAGACTGGTTCTGGTTCAAGATGTTGCCCCAATGTAACATGACCA X765551Ko.seq
 161 AAGACTGGTTCTGGTTCAAGATGTTGCCCCAATGTAACATGACCA M2-3s.seq
 161 AAGACTGGTTCTGGTTCAAGATGTTGCCCCAATGTAACATGACCA M7-1s.seq
 161 AAGACTGGTTCTGGTTCAAGATGTTGCCCCAATGTAACATGACCA M8-2s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTTACATCCCTGAGGAGATAACAGGAT X765551Ko.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTTACATCCCTGAGGAGATAACAGGAT M2-3s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTTACATCCCTGAGGAGATAACAGGAT M7-1s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTTACATCCCTGAGGAGATAACAGGAT M8-2s.seq
 241 CGCATGTACTCCCTTTTCAAGAAACTTCCAGCCTATGAGCA X765551Ko.seq
 241 CGCATGTACTCCCTTTTCAAGAAACTTCCAGCCTATGAGCA M2-3s.seq
 241 CGCATGTACTCTTCTTTTCAAGAAACTTCCAGCCTATGAGCA M7-1s.seq
 241 CGCATGTACTCTTCTTTTCAAGAAACTTCCAGCCTATGAGCA M8-2s.seq
 281 GGCAGGTGGTTGATGAGGTTAATTACACTGACTACAAAGC X765551Ko.seq
 281 GGCAGGTGGTTGATGAGGTTAATTACACTGACTACAAAGC M2-3s.seq
 281 GGCAGGTGGTTGATGAGGTTAATTACACTGACTACAAAGC M7-1s.seq
 281 GGCAGGTGGTTGATGAGGTTAATTACACTGACTACAAAGC M8-2s.seq
 321 CGTCACCTTACCATACCAACACAAACTCTGGCTTTGTA X765551Ko.seq
 321 CGTCACCTTACCATACCAACACAAACTCTGGCTTTGTA M2-3s.seq
 321 CGTCACCTTACCATACCAACACAAACTCTGGCTTTGTA M7-1s.seq
 321 CGTCACCTTACCATACCAACACAAACTCTGGCTTTGTA M8-2s.seq
 361 GGGTATCTTGCACCTACTATGAGACAAGGGGAAACCTTACCA X765551Ko.seq
 361 GGGTATCTTGCACCTACTATGAGACAAGGGGAAACCTTACCA M2-3s.seq
 361 GGGTAC[C]TGCACCTACTATGAGACAAGGGGAAACCTTACCA M7-1s.seq
 361 GGGTAC[C]TGCACCTACTATGAGACAAGGGGAAACCTTACCA M8-2s.seq
 401 CAGCCAAATTATCCATACCCGGCTCATCGGAA X765551Ko.seq
 401 CAGCCAAATTATCCATACCCGGCTCATCGGAA M2-3s.seq
 401 CAGCCAAATTATCCATACCCGGCTCATCGGAA M7-1s.seq
 401 C[G]GCCAAATTATCCATACCCGGCTCATCGGAA M8-2s.seq
 Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from X765551Ko.seq.

a

1 GTFYLNHTEKKVSI MF DSSV SWPGNDRL LSPNEFEIKRTV X765551Prot.PRC
 1 GTFYLNHTEKKVSI MF DSSV SWPGNDRL LSPNEFEIKRTV M2-3s.PRO
 1 GTFYLNHTEKKVSI MF DSSV SWPGNDRL LSPNEFEIKRTV M7-1s.PRO
 1 GTFYLNHTEKKVSI MF DSSV SWPGNDRL LSPNEFEIKRTV M8-2s.PRO
 41 DGEGYNVVAQCNMTKDWFVLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD X765551Prot.PRC
 41 DGEGYNVVAQCNMTKDWFVLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD M2-3s:PRO
 41 DGEGYNVVAQCNMTKDWFVLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD M7-1s:PRO
 41 DGEGYNVVAQCNMTKDWFVLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD M8-2s:PRO
 81 RMYSEFRNFQPMMSRQVVDEVNYTDYKAVTLPLYQHNNSGEV X765551Prot.PRC
 81 RMYSEFRNFQPMMSRQVVDEVNYTDYKAVTLPLYQHNNSGEV M2-3s:PRO
 81 RMYSEFRNFQPMMSRQVVDEVNYTDYKAVTLPLYQHNNSGEV M7-1s:PRO
 81 RMYSEFRNFQPTSRQVVDEVNYTDYKAVTLPLYQHNNSGEV M8-2s:PRO
 121 GYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG X765551Prot.PRC
 121 GYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M2-3s:PRO
 121 GYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M7-1s:PRO
 121 GYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M8-2s:PRO
 Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from X765551Prot.PRO.

b

Fig. 3a

69

1 GGCAC TTTTACCTAACACACTTCAAGAAGGTCTCGA AF065068Ko.seq
 1 GGCAC **C** TTTTACCTAACACACTTCAAGAAGGTCTCTCCA M6-1s.seq
 41 TCA TGT TGTGACTCTCAGTCAGCTGGCCTGGCAATGACAG AF065068Ko.seq
 41 TCA TGT TGTGACTCTCAGTCAGCTGGCCTGGCAATGACAG M6-1s.seq
 81 GCT GTT GTCTCCAAATGAGTTGAAATCAAGCGGCACTGTG AF065068Ko.seq
 81 GCT GTT GTCTCCAAATGAGTTGAAATCAAGCGGCACTGTG M6-1s.seq
 121 GATGGGGAGGATACAATGTGGCCCAATGCAACATGACCA AF065068Ko.seq
 121 GATGGGGAGGATACAATGTGGCCCAATGCAACATGACCA M6-1s.seq
 161 AAGACTGGTCTGGTTGAGATGCTTGCCAACTACAAACAT AF065068Ko.seq
 161 AAGACTGGTCTGGTTGAGATGCTTGCCAACTACAAACAT M6-1s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTTACATCCTGAGGATAAACAGGAT AF065068Ko.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTTACATCCTGAGGATAAACAGGAT M6-1s.seq
 241 CGATGTACTCCCTTTTACAGAACTTCCAGGCTATGAGCA AF065068Ko.seq
 241 CGATGTACTCCCTTTTACAGAACTTCCAGGCTATGAGCA M6-1s.seq
 281 GGTAGGTGGTTGATGAGGTTAATTACACTGACTACAAAGC AF065068Ko.seq
 281 GGTAGGTGGTTGATGAGGTTAATTACACTGACTACAAAGC M6-1s.seq
 321 GTCACCTTACCATATCAACAAACACTCTGGCTTTGTA AF065068Ko.seq
 321 GTCACCTTACCATATCAACAAACACTCTGGCTTTGTA M6-1s.seq
 361 GATACCTTGCAGCTACTATGAGACAAAGGGAACTTAC AF065068Ko.seq
 361 GATACCTTGCAGCTACTATGAGACAAAGGGAACTTAC M6-1s.seq
 401 CAGCCATTATCCATACCCGGCTCATCGGAA AF065068Ko.seq
 401 CAGCCATTATCCATACCCGGCTCATCGGAA M6-1s.seq
 Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from AF065068Ko.seq.

a

1 GTFYLNHTEKKVSLMFDSSVSWPGNDRLLSPNEEIKRTV AF065068Prot.PRC
 1 GTFYLNHTEKKVSLMFDSSVSWPGNDRLLSPNEEIKRTV M6-1s.PRC
 41 DGE GYNVAQCNMTKDWFLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD AF065068Prot.PRC
 41 DGE GYNVAQCNMTKDWFLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD M6-1s.PRC
 81 RMYSEFFRHFQPMRSRQVVDEVNYTDYKAVTLPYQHHNSGEV AF065068Prot.PRC
 81 RMYSEFFRHFQPMRSRQVVDEVNYTDYKAVTLPYQHHNSGEV M6-1s.PRC
 121 GYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG AF065068Prot.PRC
 121 GYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M6-1s.PRC
 Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from AF065068Prot.PRC.

b

Fig. 3b

109-99

40

1 GGCACCTTTAACCTAACACACTTCAAGAAGGTCCTCA AF065065KO.seq
 1 GGCACCTTTAACCTAACACACTTCAAGAAGGTCCTCA M3-3p-2.seq
 1 GGCACCTTTAACCTAACACACTTCAAGAAGGTCCTCA M5-1s.seq
 1 GGCACCTT[C]AACCTAACACACTTCAAGAAGGTCCTCA M9-2s.seq
 1 GGCACCTT[G]AACCTAACACACTTCAAGAAGGTCCTCA AF065065KO.seq
 41 TCACTGTTGACTCCCTCAGTCAGCTGGCAATGACAG AF065065KO.seq
 41 TCACTGTTGACTCCCTCAGTCAGCTGGCAATGACAG M3-3p-2.seq
 41 TCACTGTTGACTCCCTCAGTCAGCTGGCAATGACAG M5-1s.seq
 41 TCACTGTTGACTCCCTCAGTCAGCTGGCAATGACAG M9-2s.seq
 81 GCTGTTGAGCCCCAAATGAGTTGAAATCAAGCGCACTGTG AF065065KO.seq
 81 GCTGTTGAGCCCCAAATGAGTTGAAATCAAGCGCACTGTG M3-3p-2.seq
 81 GCTGTTGAGCCCCAAATGAGTTGAAATCAAGCGCACTGTG M5-1s.seq
 81 GCTGTTGAGCCCCAAATGAGTTGAAATCAAGCGCACTGTG M9-2s.seq
 121 GACGGGGAGGGTACAAATSTGGCCCAATGTAACATGACCA AF065065KO.seq
 121 GACGGGGAGGGTACAAATSTGGCCCAATGTAACATGACCA M3-3p-2.seq
 121 GACGGGGAGGGTACAAATGTTGGCAATGTAACATGACCA M5-1s.seq
 121 GACGGGGAGGGTACAAATGTTGGCAATGTAACATGACCA M9-2s.seq
 161 AAGACTGGTTCTGAGATGCTTGCACACTAACAT AF065065KO.seq
 161 AAGACTGGTTCTGAGATGCTTGCACACTAACAT M3-3p-2.seq
 161 AAGACTGGTTCTGAGATGCTTGCACACTAACAT M5-1s.seq
 161 AAGACTGGTTCTGAGATGCTTGCACACTAACAT M9-2s.seq
 201 TGGCTTACCAAGGGCTTTTACAT[H]CTGAGGGATACAAAGGAT AF065065KO.seq
 201 TGGCTTACCAAGGGCTTTTACAT[H]CTGAGGGATACAAAGGAT M3-3p-2.seq
 201 TGGCTTACCAAGGGCTTTTACAT[C]CTGAGGGATACAAAGGAT M5-1s.seq
 201 TGGCTTACCAAGGGCTTTTACAT[C]CTGAGGGATACAAAGGAT M9-2s.seq
 241 CGCATGTAACCTTTTCAGAACACTTCCAGCCTATGAGCA AF065065KO.seq
 241 CGCATGTAACCTTTTCAGAACACTTCCAGCCTATGAGCA M3-3p-2.seq
 241 CGCATGTAACCTTTTCAGAACACTTCCAGCCTATGAGCA M5-1s.seq
 241 CGCATGTAACCTTTTCAGAACACTTCCAGCCTATGAGCA M9-2s.seq
 281 GGCAGGGTGGT[G]ATGAGGTAAATTACACTGAGTACAAAGC AF065065KO.seq
 281 GGCAGGGTGGT[G]ATGAGGTAAATTACACTGAGTACAAAGC M3-3p-2.seq
 281 GGCAGGGTGGT[G]ATGAGGTAAATTACACTGAGTACAAAGC M5-1s.seq
 281 GGCAGGGTGGT[G]ATGAGGTAAATTACACTGAGTACAAAGC M9-2s.seq
 321 CGTCACCTTACCAACACAAACACTCTGGCTTTGTA AF065065KO.seq
 321 CG[G]ACCTTACCAACACAAACACTCTGGCTTTGTA M3-3p-2.seq
 321 CGTCACCTTACCAACACAAACACTCTGGCTTTGTA M5-1s.seq
 321 CGTCACCTTACCAACACAAACACTCTGGCTTTGTA M9-2s.seq
 361 GGGTATCTTGACCTACTATGAGACAAAGGGGAAACCTTAC AF065065KO.seq
 361 GGGTATCTTGACCTACTATGAGACAAAGGGGAAACCTTAC M3-3p-2.seq
 361 GGGTATCTTGACCTACTATGAGACAAAGGGGAAACCTTAC M5-1s.seq
 361 GGGTATCTTGACCTACTATGAGACAAAGGGGAAACCTTAC M9-2s.seq
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATT[G]GGAA AF065065.prc
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATT[G]GGAA M3-3p.prc
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATT[G]GGAA M5-1s.seq
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATT[G]GGAA M9-2s.seq
 Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from AF065065KO.seq.

a

1 GTFYLNHTFKKVSI[M]EDSSVSWPGNDRLLSPNEFEIKRTV AF065065.prc
 1 GTFYLNHTFKKVSI[M]EDSSVSWPGNDRLLSPNEFEIKRTV M3-3p.prc
 1 GTFYLNHTFKKVSI[M]EDSSVSWPGNDRLLSPNEFEIKRTV M5-1s.prc
 1 GTFYLNHTFKKVSI[M]EDSSVSWPGNDRLLSPNEFEIKRTV M9-2s.prc
 41 DGE[G]YNVAQCNMT[K]DWFLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD AF065065.prc
 41 DGE[G]YNVAQCNMT[K]DWFLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD M3-3p.prc
 41 DGE[G]YNVAQCNMT[K]DWFLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD M5-1s.prc
 41 DGE[G]YNVAQCNMT[K]DWFLVQMLANYNIGYQGFYIPEGYKD M9-2s.prc
 81 RMYSEFRNEQPMMSRQVVDEVNYTDYKAVTL[Q]HNNSGEV AF065065.prc
 81 RMYSEFRNEQPMMSRQV[A]DEXNYTDYKAGTLPYQHNNSGEV M3-3p.prc
 81 RMYSEFRNEQPMMSRQVVDEVNYTDYKAVTL[Q]HNNSGEV M5-1s.prc
 81 RMYSEFRNEQPMMSRQVVDEVNYTDYKAVTL[Q]HNNSGEV M9-2s.prc
 121 GYLAPTMRQGEPYYPANYPYPLIG AF065065.prc
 121 GYLAPTMRQGEPYYPANYPYPLIG M3-3p.prc
 121 GYLAPTMRQGEPYYPANYPYPLIG M5-1s.prc
 121 GYLAPTMRQGEPYYPANYPYPLIG M9-2s.prc
 Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from AF065065.prc.

b

Fig. 3c

91

1 GGCACCTTTACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTGA M2-3s.seq
 1 GGCACCTTTACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTGA M5-1s.seq
 1 GGCACCTTTACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTGA M6-1s.seq
 1 GGCACCTTCTACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTGA M7-1s.seq
 1 GGCACCTTCTACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTGA M8-2s.seq
 1 GGCACCTTCTACCTTAACCAACACTTCAAGAAGGTCTCCATCATGTTGA M9-2s.seq
 51 CTCCTCAGTCAGCTGGCTGGCAATGACAGGCCTGTTGAGGCCAAATGAGT M2-3s.seq
 51 CTCCTCAGTCAGCTGGCTGGCAATGACAGGCCTGTTGAGGCCAAATGAGT M5-1s.seq
 51 CTCCTCAGTCAGCTGGCTGGCAATGACAGGCCTGTTGAGGCCAAATGAGT M6-1s.seq
 51 CTCCTCAGTCAGCTGGCTGGCAATGACAGGCCTGTTGAGGCCAAATGAGT M7-1s.seq
 51 CTCCTCAGTCAGCTGGCTGGCAATGACAGGCCTGTTGAGGCCAAATGAGT M8-2s.seq
 51 CTCCTCAGTCAGCTGGCTGGCAATGACAGGCCTGTTGAGGCCAAATGAGT M9-2s.seq
 101 TTGAATCAAGCGCACTGTGGACGGGAAGGCTACAAATGTCCTCCAAATGCT M2-3s.seq
 101 TTGAATCAAGCGCACTGTGGACGGGAAGGCTACAAATGTCCTCCAAATGCT M5-1s.seq
 101 TTGAATCAAGCGCACTGTGGATGGGAAGGATACAAATGTCCTCCAAATGCT M6-1s.seq
 101 TTGAATCAAGCGCACTGTGGACGGGAAGGATACAAATGTCCTCCAAATGCT M7-1s.seq
 101 TTGAATCAAGCGCACTGTGGACGGGAAGGATACAAATGTCCTCCAAATGCT M8-2s.seq
 101 TTGAATCAAGCGCACTGTGGACGGGAAGGATACAAATGTCCTCCAAATGCT M9-2s.seq
 151 AACATGACCAAGAGACTGGTTCTGGTACAGATGCTTGCCTAAATACAT M2-3s.seq
 151 AACATGACCAAGAGACTGGTTCTGGTACAGATGCTTGCCTAAATACAT M5-1s.seq
 151 AACATGACCAAGAGACTGGTTCTGGTACAGATGCTTGCCTAAATACAT M6-1s.seq
 151 AACATGACCAAGAGACTGGTTCTGGTACAGATGCTTGCCTAAATACAT M7-1s.seq
 151 AACATGACCAAGAGACTGGTTCTGGTACAGATGCTTGCCTAAATACAT M8-2s.seq
 151 AACATGACCAAGAGACTGGTTCTGGTACAGATGCTTGCCTAAATACAT M9-2s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTACATCCCTGAGGGATACAAAGGATCGCATGTACT M2-3s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTACATCCCTGAGGGATACAAAGGATCGCATGTACT M5-1s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTACATCCCTGAGGGATACAAAGGATCGCATGTACT M6-1s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTACATCCCTGAGGGATACAAAGGATCGCATGTACT M7-1s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTACATCCCTGAGGGATACAAAGGATCGCATGTACT M8-2s.seq
 201 TGGCTACCAAGGGCTTTACATCCCTGAGGGATACAAAGGATCGCATGTACT M9-2s.seq
 251 CTTTTTCAGAAACTTCCAGCTATGAGCAGGGTGGTTGATGAGGTT M2-3s.seq
 251 CTTTTTCAGAAACTTCCAGCTATGAGCAGGGTGGTTGATGAGGTT M5-1s.seq
 251 CTTTTTCAGAAACTTCCAGCTATGAGCAGGGTGGTTGATGAGGTT M6-1s.seq
 251 CTTTTTCAGAAACTTCCAGCTATGAGCAGGGTGGTTGATGAGGTT M7-1s.seq
 251 CTTTTTCAGAAACTTCCAGCTATGAGCAGGGTGGTTGATGAGGTT M8-2s.seq
 251 CTTTTTCAGAAACTTCCAGCTATGAGCAGGGTGGTTGATGAGGTT M9-2s.seq
 301 AATTACACTGACTACAAAGCCGTCACCTTACCATACCAACACAAACACTC M2-3s.seq
 301 AATTACACTGACTACAAAGCCGTCACCTTACCATACCAACACAAACACTC M5-1s.seq
 301 AATTACACTGACTACAAAGCCGTCACCTTACCATACCAACACAAACACTC M6-1s.seq
 301 AATTACACTGACTACAAAGCCGTCACCTTACCATACCAACACAAACACTC M7-1s.seq
 301 AATTACACTGACTACAAAGCCGTCACCTTACCATACCAACACAAACACTC M8-2s.seq
 301 AATTACACTGACTACAAAGCCGTCACCTTACCATACCAACACAAACACTC M9-2s.seq
 351 TGGCTTTGTAAGGGTATCTTGACCTACTATGAGACAAGGGAACCTTAC M2-3s.seq
 351 TGGCTTTGTAAGGGTATCTTGACCTACTATGAGACAAGGGAACCTTAC M5-1s.seq
 351 TGGCTTTGTAAGGGTATACCTTGCCTACTATGAGACAAGGGAACCTTAC M6-1s.seq
 351 TGGCTTTGTAAGGGTACCTTGCACCTACTATGAGACACAGGGAACCTTAC M7-1s.seq
 351 TGGCTTTGTAAGGGTACCTTGCACCTACTATGAGACACAGGGAACCTTAC M8-2s.seq
 351 TGGCTTTGTAAGGGTACCTTGCACCTACTATGAGACACAGGGAACCTTAC M9-2s.seq
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATCGGAA M2-3s.seq
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATCGGAA M5-1s.seq
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATCGGAA M6-1s.seq
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATCGGAA M7-1s.seq
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATCGGAA M8-2s.seq
 401 CAGCCAATTATCCATACCCGCTCATCGGAA M9-2s.seq

Decoration 'Decoration #1': Box residues that differ from the Consensus..

Fig. 4a

09-99

42

1 GTEYLHNHTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQC M2-3s.PRC
 1 GTFYLHNHTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQC M5-1s.PRC
 1 GTFYLHNHTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQC M6-1s.PRC
 1 GTFYLHNHTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQC M7-1s.PRC
 1 GTFYLHNHTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQC M8-2s.PRC
 1 GTFYLHNHTFKKVSIMFDSSVSWPGNDRLSPNEFEIKRTVDGEGYNVAQC M9-2s.PRC
 51 NMTKDWFLVQMLANYNIGYQGYIPEGYKDRMYSFFRNFQPMRSRQVVDEV M2-3s.PRC
 51 NMTKDWFLVQMLANYNIGYQGYIPEGYKDRMYSFFRNFQPMRSRQVVDEV M5-1s.PRC
 51 NMTKDWFLVQMLANYNIGYQGYIPEGYKDRMYSFFRNFQPMRSRQVVDEV M6-1s.PRC
 51 NMTKDWFLVQMLANYNIGYQGYIPEGYKDRMYSFFRNFQPMRSRQVVDEV M7-1s.PRC
 51 NMTKDWFLVQMLANYNIGYQGYIPEGYKDRMYSFFRNFQPMRSRQVVDEV M8-2s.PRC
 51 NMTKDWFLVQMLANYNIGYQGYIPEGYKDRMYSFFRNFQPMRSRQVVDEV M9-2s.PRC
 101 NYTDYKAVTLPYQHNNSGFVGYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M2-3s.PRC
 101 NYTDYKAVTLPYQHNNSGFVGYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M5-1s.PRC
 101 NYTDYKAVTLPYQHNNSGFVGYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M6-1s.PRC
 101 NYTDYKAVTLPYQHNNSGFVGYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M7-1s.PRC
 101 NYTDYKAVTLPYQHNNSGFVGYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M8-2s.PRC
 101 NYTDYKAVTLPYQHNNSGFVGYLAPTMRQGEPYPANYPYPLIG M9-2s.PRC

Decoration 'Decoration E1': Box residues that differ from the consensus.

Fig. 4b

13.06.99

45

1 ctctctatat aatataccctt atagatggaa tggtgccaaac atgtttatgt ggtaatttaa
 61 aaaaagtgcg gctgtgttgt gattggctgt gggggtgaaatg actaaccatgg gcgggggcggc
 121 cgtggggaaaa tgacgtgact tatgigggatg gaggttatgtt gcacgttttt gcgggtttatg
 181 tgtacgtaaaa ggagggtgtgg tttggaaacacg ggatgtatgaca gtttttccac gcttactgtat
 241 ccgtatgtat gtatgtttgg gcggatgtcc gtggaaatcc tccattttcg cgcggaaact
 301 gaatgaggaa gigaattttt gagtcatttc gcggatgtgt cagggtggat tatgtcccg
 361 ggggccgatgt gactttgacc gtttacgtgg aggttttcgat accgttgtt tccatctaa
 421 ttttccacata cggtgtccaa gtccctgtttt tttacgttgg tgtcaatgt tgcgttggat
 481 attttaaactt gacgagttcc gtcaagaggc cacttttqaq taccaqcqaa aaatgttttc
 541 tcctccgcgc cgcaagtca ttctgcgtt tgaadatgt acaccgtgcgc tccctgcac
 601 aggagattat ctccagtgt gacgggatcg aaataactgtt gtttgtggta aataccctaa
 661 tgggagacgt cccgaaaccg ccagtgcacg cttttgtatcc acctacgtgt cacgtatctat

Fig. 5

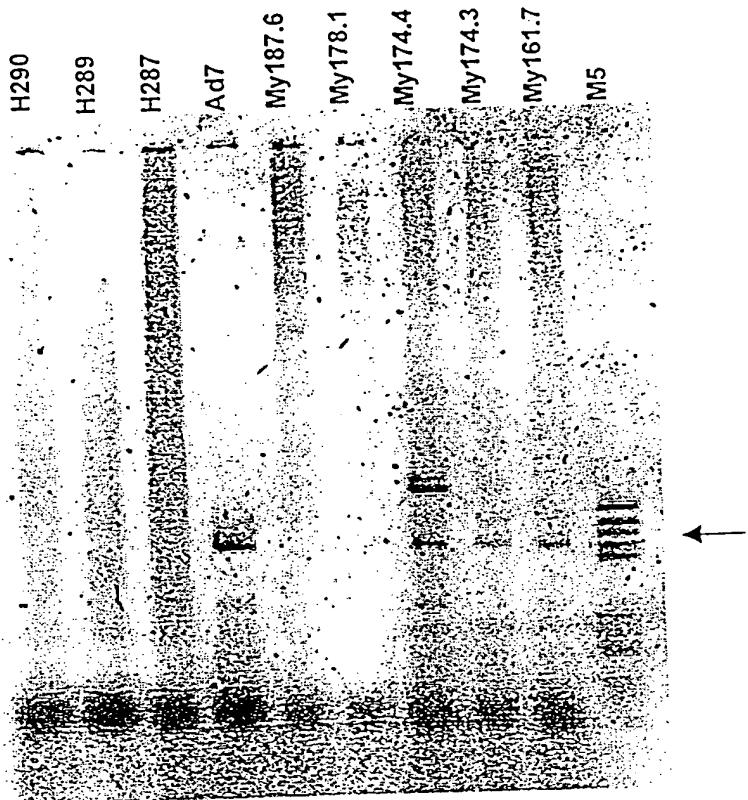


Fig. 6

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- BLACK BORDERS**
- IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- FADED TEXT OR DRAWING**
- BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- SKEWED/SLANTED IMAGES**
- COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- GRAY SCALE DOCUMENTS**
- LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)